

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 21/02, C12N 15/12, 1/21, A61K 38/43, 38/48, 38/16, G01N 33/53, A23L 1/305 // C07K 14/745, 14/78, 16/18, 19/00, (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/55643</p> <p>(43) 国際公開日 1998年12月10日(10.12.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02449</p> <p>(22) 国際出願日 1998年6月3日(03.06.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/160422 1997年6月3日(03.06.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 呉羽化学工業株式会社 (KUREHA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8552 東京都中央区日本橋堀留町一丁目9番11号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 広瀬国孝(HIROSE, Kunitaka)[JP/JP] 〒179-0074 東京都練馬区春日町4丁目8番16号 Tokyo, (JP) 井野口英司(INOBUCHI, Eiji)[JP/JP] 〒374-0057 群馬県館林市北成島町734の2 Gunma, (JP) 箱崎充徳(HAKOZAKI, Michinori)[JP/JP] 〒333-0847 埼玉県川口市芝中田1丁目30番3号 メゾン高柳102号 Saitama, (JP)</p>	<p>石岡恵子(ISHIOKA, Keiko)[JP/JP] 〒187-0011 東京都小平市鈴木町2丁目180番8号103号 Tokyo, (JP)</p> <p>石田裕香子(ISHIDA, Yukako)[JP/JP] 〒201-0001 東京都狛江市西野川4丁目6番1号 京王柴崎コーポラス508号 Tokyo, (JP)</p> <p>松島綱治(MATSUSHIMA, Koji)[JP/JP] 〒271-0092 千葉県松戸市松戸159-1 松戸第3住宅2-905 Chiba, (JP)</p> <p>久野耕嗣(KUNO, Koji)[JP/JP] 〒920-0965 石川県金沢市笠舞1丁目1の17 白翠荘 Ishikawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi) 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, KR, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: HUMAN ADAMTS-1 PROTEIN, GENE CODING FOR THE SAME, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND METHOD FOR IMMUNOLOGICALLY ASSAYING HUMAN ADAMTS-1 PROTEIN</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトADAMTS-1タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及びヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法</p> <p>(57) Abstract A human ADAMTS- protein, a gene coding for the same, a pharmaceutical composition containing the protein as the active ingredient, and a method for immunologically assaying a human ADAMTS-1 protein. The protein can lower the number of leukocytes and thrombocytes and at the same time can increase the number of erythrocytes.</p>		

(57)要約

ヒトADAMTS-1タンパク質、それをコードする遺伝子、有効成分として前記タンパク質を含有する医薬組成物、及びヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法を開示する。前記タンパク質は、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TC	タークス
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CC	中央アフリカ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン			NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

## 明 細 書

ヒトADAMTS-1タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及びヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法

## 技術分野

本発明は、ヒトADAMTS-1タンパク質、それをコードする遺伝子、医薬組成物、及びヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法に関する。

## 背景技術

マウスADAMTS (A d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e w i t h t h r o m b o s p o n d i n m o t i f s) -1 遺伝子は、マウスに移植すると癌悪疫質を引き起こすマウス大腸癌細胞株から、cDNAとして単離された遺伝子であり、この遺伝子にコードされるマウスADAMTS-1タンパク質は、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及び3個のトロンボスポンジンドメインを有するユニークなタンパク質である [J. Biol. Chem. , 272, 556-562 (1997)]。

マウスADAMTS-1タンパク質の生理学的機能は未だに不明であるが、前記タンパク質に含まれている個々の機能ドメインについては、すでに種々の報告がある。

例えば、ヘビ毒のディスインテグリンは、システインに富み、抗血液凝固作用を有するタンパク質のファミリーに属する [Semin. Hematol. , 31, 289-300 (1994)]。

また、例えば、マトリックスメタロプロテアーゼドメインとディスインテグリンドメインとを有するタンパク質ファミリーとしては、従来から、ADAM (A d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e i n a s e) ファミリーが知られている [Nature, 377, 652-656 (1995) ; Nature Genet. , 5, 151-157 (1993) ; Natur

e, 356, 248-252 (1992)]。

これまでにADAMファミリーとして知られるタンパク質としては、例えば、ファァティリン (fertilin)、エピダーマルアピカルプロテイン (epidermal apical protein)、シリテスチン (cyritestin)、MDC (システイン含有量の高いメタロプロテアーゼ様ディスインテグリン様タンパク質; metalloprotease-like, disintegrin-like and cysteine-rich protein)、メルトリン (meltrin)、MS2、及びメタージディン (metargidin) を挙げることができる [Nature, 377, 652-656 (1995); Nature Genet. 5, 151-157 (1993); Nature, 356, 248-252 (1992); Biochem. J., 286, 671-675 (1992); Dev. Growth. Differ., 36, 49-58 (1994); Int. Immunol., 2, 585-591 (1990); J. Biol. Chem., 271, 4593-4596 (1996)]。

ファァティリンは、インテグリンを介する精子と卵子の結合に関与しているとの報告 [Nature, 356, 248-252 (1992)] があり、メルトリンは、筋間形成に関与しているとの報告 [Nature, 377, 652-656 (1995)] がある。主として中枢神経などで発現しているMDCは、ヒト乳癌の抑制に働く候補タンパク質である [Nature Genet. 5, 151-157 (1993)]。また、MS2は、マクロファージの1つの抗原として働いている [Int. Immunol., 2, 585-591 (1990)]。しかし、これらADAMファミリーに属するタンパク質の生理学的役割は依然として多くは不明である。

マウスADAMTS-1タンパク質は、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン及びディスインテグリンドメインを有するので、ADAMファミリーに属するが、トロンボスポンジンドメインを有する点で、従来公知のADAMファミリーに属するタンパク質とは異なる。

マトリックスメタロプロテアーゼドメイン及びディスインテグリンドメインを

有するADAMファミリーには、先に述べたように、骨や筋肉代謝、癌増殖抑制、又は受精に関与する各種タンパク質が含まれ、また、トロンボスポンジンには血管新生阻害作用、及び癌抑制作用があることから、マウスADAMTS-1タンパク質には特徴的生理機能があると思われる。

本発明者は、未知のヒトADAMTS-1タンパク質を取得することを目指して、既知のマウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列を基に設計した各種プローブを用いて、ヒト腎臓cDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法によりヒトADAMTS-1遺伝子を取得しようと試みたところ、目的の遺伝子を取得することはできなかった。また、既知のマウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列を基に設計した各種プライマーを用いて、ヒト腎臓cDNAライブラリーを鋳型とするPCR法を通常の条件で実施することによって目的遺伝子の取得を試みたが、成功しなかった。そこで、本発明者は、前記のプライマーを用いて、通常よりも緩い条件、すなわち、アニーリング温度を通常よりも低い条件で、ヒト腎臓cDNAライブラリーを鋳型とするPCR法を実施することにより、新規のヒトADAMTS-1遺伝子を単離することができた。こうして得られた遺伝子を大腸菌で産生させ、得られた組換えヒトADAMTS-1タンパク質の生物活性を検討したところ、驚くべきことに、新規のヒトADAMTS-1タンパク質が、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を有することが判明した。このような造血機能に影響を与える活性は、プライマーを設計するのに参照したマウスADAMTS-1遺伝子の由来からは予想することができず、また、ヒトADAMTS-1タンパク質に含まれる各ドメインの機能からも予想することができないものである。本発明は、このような知見に基づくものである。

#### 発明の開示

本発明は、配列表の配列番号1の配列：

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser  
Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu  
Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val

Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu  
Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu  
Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln  
Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr  
Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp  
Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser  
Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala  
His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp  
Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro  
Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu



Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu  
Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser  
Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly  
Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser

で表わされるアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質に関する。

また、本発明は、配列表の配列番号 1 の前記配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体に関する。

また、本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有することを特徴とするタンパク質（但し、マウス ADAMTS-1 タンパク質を除く）に関する。

また、本発明は、これらの新規タンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子に関する。

また、本発明は、前記遺伝子を含むことを特徴とするベクターに関する。

また、本発明は、前記ベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体に関する。

また、本発明は、（１）配列表の配列番号 1 の前記配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、（２）配列表の配列番号 1 の前記配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は（３）マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポン

ジンドメインを有するタンパク質を含有することを特徴とする医薬組成物に関する。

また、本発明は、前記の新規タンパク質と特異的に反応することを特徴とする免疫反応性物質（例えば、ポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体、若しくはこれらの抗体フラグメント、又は抗血清など）に関する。

また、本発明は、前記免疫反応性物質と、被検試料とを接触させ、ヒトADAMTS-1タンパク質と前記免疫反応性物質との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法に関する。

また、本発明は、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、被検試料とを接触させ、ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAと前記遺伝子との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの分析方法に関する。

また、本発明は、ヒトADAMTS-1タンパク質、又はそのmRNAを分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法に関する。

更に、本発明は、ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質、又はヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PCR法により得られたFlag-1DNA断片の電気泳動の結果を示す図面である。

図2は、マウスADAMTS-1遺伝子とFlag-1DNA断片との相同性を示す説明図である。

図3は、Flag-1DNA断片のドットハイブリダイゼーションの結果を示す説明図である。

図4は、RACE法により得られたFlag-2DNA断片の電気泳動の結果を示す図面である。

図5は、本発明のヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子とのホモロジー（第1番目～第480番目の塩基配列）を示す説明図である。

図6は、本発明のヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子とのホモロジー（第481番目～第960番目の塩基配列）を示す説明図である。

図7は、本発明のヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子とのホモロジー（第961番目～第1440番目の塩基配列）を示す説明図である。

図8は、本発明のヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子とのホモロジー（第1441番目～第1920番目の塩基配列）を示す説明図である。

図9は、本発明のヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子とのホモロジー（第1921番目～第2184番目の塩基配列）を示す説明図である。

図10は、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質とマウスADAMTS-1タンパク質とのホモロジー（第1番目～第240番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。

図11は、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質とマウスADAMTS-1タンパク質とのホモロジー（第241番目～第510番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。

図12は、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質とマウスADAMTS-1タンパク質とのホモロジー（第511番目～第727番目のアミノ酸配列）を示す説明図である。

図13は、PCR法により得られた本発明によるヒトADAMTS-1遺伝子の完全長のcDNAの電気泳動の結果を示す図面である。

図14は、本発明のプラスミドpG/ADAMTS-1の構造を模式的に示す説明図である。

図15は、プラスミドpG/ADAMTS-1により形質転換された形質転換体の電気泳動の結果を示す図面である。

図16は、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の電気泳動の結果を示す図面である。

図17は、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質のマウス静脈単回投与による血球細胞数に与える作用を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によるヒトADAMTS-1タンパク質は、アミノ酸残基727個からなり、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなる新規のタンパク質である。本発明のヒトADAMTS-1タンパク質は、図10～図12に示すように、N末端アミノ酸残基であるメチオニンから数えて第12番目～第230番目のアミノ酸残基からなるマトリックスメタロプロテアーゼ（以下、MMPと称することがある）ドメイン、第235番目～第305番目のアミノ酸残基からなるディスインテグリン（以下、DIと称することがある）ドメイン、並びに第322番目～第372番目、第618番目～第664番目、及び第672番目～第727番目のアミノ酸残基からなる3個のトロンボスポンジン（以下、TSPと称することがある）ドメインを有する。また、塩基性アミノ酸であるアルギニン及びリジンがC末端領域に多く存在し、このことから、ヒトADAMTS-1タンパク質は、血液中においてヘパリンやヘパラン硫酸などの硫酸化多糖分子と相互作用していると思われる。

本発明による新規タンパク質には、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、又は配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質の機能的に等価な改変体（以下、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体と称する）が含まれる。

本明細書において、「ヒトADAMTS-1タンパク質改変体」とは、そのアミノ酸配列が、ヒトADAMTS-1タンパク質のアミノ酸配列、すなわち、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列において、1又はそれ以上（特には1又は数個）のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列であって、かつヒトADAMTS-1活性を有するタンパク質を意味する。前記のヒ

トADAMTS-1タンパク質改変体としては、ヒトADAMTS-1タンパク質に対するアミノ酸配列におけるホモロジーが92%以上である改変体が好ましい。なお、前記のヒトADAMTS-1タンパク質改変体には、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含む前記タンパク質の一部であり、かつヒトADAMTS-1活性を有する断片、あるいは、或る改変体的一部分であり、かつヒトADAMTS-1活性を有する断片も含まれる。

また、本明細書において、「ヒトADAMTS-1活性」とは、造血機能に影響を与える活性、例えば、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を意味する。

本発明の新規タンパク質には、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質（以下、「ADAMTSタンパク質」と称する）が、更に含まれる。但し、本発明の新規タンパク質には、マウスADAMTS-1タンパク質は含まれない。

本明細書において、「マトリックスメタロプロテアーゼドメイン」とは、ヒトADAMTS-1タンパク質のマトリックスメタロプロテアーゼドメインのアミノ酸配列（すなわち、配列表の配列番号1の配列における第12番目～第230番目のアミノ酸配列）に対するホモロジーが50%以上（好ましくは95%以上）であるアミノ酸配列を有するドメインを意味する。

また、本明細書において、「ディスインテグリンドメイン」とは、ヒトADAMTS-1タンパク質のディスインテグリンドメインのアミノ酸配列（すなわち、配列表の配列番号1の配列における第235番目～第305番目のアミノ酸配列）に対するホモロジーが50%以上（好ましくは93%以上）であるアミノ酸配列を有するドメインを意味する。

更に、本明細書において、「トロンボスポンジンドメイン」とは、ヒトADAMTS-1タンパク質における3種類のトロンボスポンジンドメインの内、少なくともいずれか1種類のトロンボスポンジンドメインのアミノ酸配列に対するホモロジーが50%以上であるアミノ酸配列を有するドメインを意味する。すなわち、

(1) ヒトADAMTS-1タンパク質におけるN末端から第1番目のトロンボ

スポンジンドメイン（以下、ヒトTSP-1ドメインと称することがある）のアミノ酸配列（すなわち、配列表の配列番号1の配列における第322番目～第372番目のアミノ酸配列）に対するホモロジーが50%以上（好ましくは99%以上）であるか；

（2）ヒトADAMTS-1タンパク質におけるN末端から第2番目のトロンスポンジンドメイン（以下、ヒトTSP-2ドメインと称することがある）のアミノ酸配列（すなわち、配列表の配列番号1の配列における第618番目～第664番目のアミノ酸配列）に対するホモロジーが50%以上（好ましくは88%以上）であるか；あるいは、

（3）ヒトADAMTS-1タンパク質におけるN末端から第3番目のトロンスポンジンドメイン（以下、ヒトTSP-3ドメインと称することがある）のアミノ酸配列（すなわち、配列表の配列番号1の配列における第672番目～第727番目のアミノ酸配列）に対するホモロジーが50%以上（好ましくは88%以上）である

アミノ酸配列を有するドメインを意味する。

本発明のADAMTSタンパク質においては、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンスポンジンドメインをそれぞれ少なくとも1個以上、同時に含有するタンパク質である限り、各ドメインの含有数、及び各ドメインの配置順序は特に限定されるものではないが、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン1個、ディスインテグリンドメイン1個、及びトロンスポンジンドメイン3個を有することが好ましい。また、各ドメインが、タンパク質のN末端からC末端に向かう方向に沿って、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンスポンジンドメインの順序で配置されていることが好ましく、トロンスポンジンドメインを3個含む場合には、マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、第1のTSPドメイン、第2のTSPドメイン、及び第3のTSPドメインの順序で配置されていることがより好ましい。

本発明によるADAMTSタンパク質としては、

（1）前記マトリックスメタロプロテアーゼドメインが、ヒトADAMTS-1

タンパク質のマトリックスメタロプロテアーゼドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが95%以上であり；

(2) 前記ディスインテグリンドメインが、ヒトADAMTS-1タンパク質のディスインテグリンドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが93%以上であり；そして、

(3) 前記トロンボスポンジンドメインの少なくとも1個が、ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-1ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが99%以上であるか；ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-2ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが88%以上であるか；あるいは、ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-3ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが88%以上であることが好ましい。

本発明によるADAMTSタンパク質がトロンボスポンジンドメインを3個含む場合には、更に、

(3-1) N末端から第1番目のトロンボスポンジンドメインが、ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-1ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが99%以上であり；

(3-2) N末端から第2番目のトロンボスポンジンドメインが、ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-2ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが88%以上であり；そして、

(3-3) N末端から第3番目のトロンボスポンジンドメインが、ヒトADAMTS-1タンパク質のTSP-3ドメインに対するアミノ酸配列におけるホモロジーが88%以上であることがより好ましい。

本発明によるタンパク質は、種々の公知の方法によって得ることができる。例えば、本発明による遺伝子を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することもできるし、あるいは、公知のタンパク質化学的手法により天然由来の本発明のタンパク質を精製することもできる。

本発明の遺伝子には、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトADAMTS-1）、又はヒトADAMTS-1タンパク質改変体をコードする遺伝子が含まれ、更には、ADAMTSタンパク

質（但し、マウスADAMTS-1タンパク質を除く）をコードする遺伝子が含まれる。なお、前記遺伝子には、DNA及びRNAの両方が含まれる。ヒトADAMTS-1タンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、配列表の配列番号2の配列：

```
ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC
CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA
TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG
GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG
GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA
GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG
AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA
GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT
ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC
TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC
CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG
TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA
ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC
TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG
GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GGC GAT CTC CCT GGC ACC
TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC
AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC
GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG
GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG
TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA
AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT
GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG
AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CGA GTG CGC TAC AGA TCC TGT
AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA
CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG
```



CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC  
AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT  
TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC  
TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC  
ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT  
GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT  
GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA  
GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT  
GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT  
TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG  
TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT  
CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT  
CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT  
TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC  
GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA  
TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG  
AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG  
CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC  
AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT  
CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT  
TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA

で表わされる塩基配列からなる遺伝子を挙げることができる。

本発明の遺伝子、例えば、配列表の配列番号2の配列で表わされる塩基配列からなる遺伝子は、例えば、本発明者が前記遺伝子を最初に取得する際に用いた以下の方法により取得することができる。

すなわち、マウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列を参照して適当な各種PCR用プライマーを作製し、通常よりも緩い条件、すなわち、アニーリング温度を通常よりも低い条件で、ヒト腎臓由来のcDNAライブラリーを鋳型DNAとしてPCR法を実行することにより、DNA断片を得ることができる。このDN

A断片の塩基配列を決定し、マウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列と比較することにより、目的遺伝子であることを確認することができる。PCR法に用いるプライマーの種類に応じて、ヒトADAMTS-1遺伝子の全配列を取得することもできるし、あるいは、ヒトADAMTS-1遺伝子の部分塩基配列を取得し、続いて、RACE法 (Rapid amplification of cDNA ends) 法 [Proc Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)] により残りの部分塩基配列を取得し、これらの部分塩基配列を遺伝子工学的手法により連結することにより全配列を取得することもできる。

なお、本発明者が実施した前記遺伝子取得方法においては、前記PCRプライマーの塩基配列を設計する際に、ヒトADAMTS-1遺伝子の塩基配列が未知であったので、マウスADAMTS-1遺伝子とヒトADAMTS-1遺伝子との間で完全な相同性を示す配列を選択することは実質的に不可能であった。

本発明者は、マウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて、通常温度条件でPCR法を実施したが、目的のDNA断片を得ることができなかった。本発明者は、同じプライマーを用いて、通常よりも緩い条件下、すなわち、通常よりも低いアニーリング温度でPCR法を実施することにより、目的とするDNA断片を得ることができた。取得したヒトADAMTS-1遺伝子の塩基配列と、前記プライマーの塩基配列を比較した結果、塩基配列の相同性は、十分なものではなかった。

本発明によってヒトADAMTS-1遺伝子の塩基配列が解明されたので、PCR法におけるプライマーの設計、又はブランクハイブリダイゼーション法におけるプローブの設計に、このヒトADAMTS-1遺伝子の塩基配列を利用することができる。このようなプライマー又はプローブを用いると、本発明の遺伝子は、本発明者がその遺伝子を最初に取得する際に用いた前記方法に限らず、公知の遺伝子取得方法、例えば、通常条件によるPCR法、又はブランクハイブリダイゼーション法などを用いても調製することができる。

なお、本発明者は、既知のマウスADAMTS-1遺伝子の塩基配列を基に設計したプローブを用いて、ブランクハイブリダイゼーション法によりヒト腎臓c

DNAライブラリーから未知のヒトADAMTS-1遺伝子を取得しようと試みたが、目的とする遺伝子を取得することができなかった。この原因として、用いたプローブの塩基配列の相同性が充分でなかったことを挙げることができるが、それ以外の原因として、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて、ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNA解析を行ったところ、その発現量が非常に少なく、cDNAライブラリーを作製しても、そのライブラリー中に含まれるヒトADAMTS-1遺伝子のコピー数が、非常に少ないためであったことを確認している。ヒトADAMTS-1遺伝子の塩基配列を基に設計したプローブを使用することにより、ブランクハイブリダイゼーション法によっても、本発明の遺伝子を取得することが可能である。

こうして得られた本発明の遺伝子を、例えば、真核生物又は原核生物を宿主として用いて、本発明のタンパク質を発現させることができる。

目的とする遺伝子を含むDNA断片を、そのまま宿主細胞に入れても増殖しないので、プラスミドのような細胞内で複製可能な染色体外遺伝子をベクターとして、発現プラスミドを作製することができる。使用することのできるベクターは、宿主細胞内での複製に必要な遺伝情報を含み、自立的に複製することができ、しかも、宿主細胞からの単離精製が容易であり、検出可能なマーカーを有することが望ましい。

本発明によるDNAを含む発現ベクターは、種々の市販のベクターを用いて、宿主細胞に応じて適宜構築することができ、これらの公知ベクターへのDNAの挿入方法も周知である。

原核生物の宿主としては、大腸菌の菌株、例えば、XL1-Blue、HB101、JM109、DH5 $\alpha$ 、AG-1、K12株294 (ATCC31446)、B、 $\chi$ 1776 (ATCC31537)、C600、若しくはW3110 (F<sup>-</sup>、 $\lambda$ 、プロトトロフィック；ATCC27375)を挙げることができる。また、バチラス属の菌株（例えば、枯草菌）、腸内細菌 [例えば、ネズミチフス菌若しくは霊菌 (*Serratia marcescens*) 等]、又はシェードモナス属の菌株等を挙げることができる。

前記の原核生物を宿主として使用する場合は、本発明による

遺伝子を発現することができるように前記遺伝子の上流にプロモーター及びSD塩基配列、更にタンパク質合成開始に必要な塩基配列・ATGを付与した発現プラスミドを使用することができる。大腸菌株等のベクターとしては、一般に、pUC19、pBR322、又はpBR327等が広く用いられている。

プロモーターとしては、例えば、トリプトファン・プロモーター、 $P_L$  プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、lppプロモーター、又は $\beta$ -ラクタマーゼプロモーター等を使用することができる。マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子、又はテトラサイクリン耐性遺伝子を挙げることができる。

真核微生物の宿主としては、酵母が一般に広く用いられ、その中でもサッカロミセス属酵母を有利に利用することができる。酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、YRp7等を用いることができる。

酵母発現用の発現ベクターのプロモーターの例としては、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)、GAL10、3-ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、又はヘキソキナーゼなどを利用することができる。マーカー遺伝子としては、trp1遺伝子等を利用することができる。

酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起源や終止コドン及びその他のDNA配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列を用いることができる。

高等動物の培養細胞を宿主とする場合には、例えば、赤毛ザル腎臓細胞、蚊幼虫の細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞(COS-7又はCOS-1等)、マウス胎児繊維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞若しくはそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株、ヒト頸上皮細胞、ヒト胎児腎臓細胞、蛾卵巣細胞、ヒト骨髓腫細胞、又はマウス繊維芽細胞等を用いることができる。

前記ベクターは、一般に、本発明のDNAを宿主細胞内で発現させるための機能配列、例えば、複製開始点、本発明DNAの上流に位置すべきプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、及び／又は転写終止配列を含有している。プロモーターとしては、例えば、アデノウイルス2主後期プロモーター、

SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルス、ラウスザルコーマウイルス、又は真核生物遺伝子からのプロモーター（例えば、エストロゲン誘導ニワトリ卵アルブミン遺伝子、インターフェロン遺伝子、グルココルチコイド誘導チロシンアミノトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、主初期及び後期アデノウイルス遺伝子、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子、又は $\alpha$ 因子遺伝子等）が好ましい。

複製開始点としては、アデノウイルス、SV40、ウシパピローマウイルス（BPV）、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、又はそれらの誘導体ベクター由来のものを用いることができる。また、この際のマーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、メトトレキセート耐性ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子、又はブラストサイアジンS耐性遺伝子等を用いることができる。

昆虫細胞の宿主としては、例えば、BmN4細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、又は*Trichoplusiani*の卵巣細胞等を用いることができる。また、カイコの幼虫個体も用いることもできる。昆虫細胞への遺伝子導入のためには、ウイルスDNAと目的遺伝子を組み込んだトランスファーベクターとを昆虫細胞に共感染させて行うことができる。ウイルスDNAとしては、例えば、*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*、又は*Autographica californica multiple nuclear polyhedrosis virus*等を用いることができる。目的遺伝子を挿入するトランスファーベクターとしては、例えば、ポリヘドリンプロモーターやp10プロモーターベクターが使用可能であり、これらのプロモーターの下流に目的遺伝子を組み込むことができる。また、トランスファーベクターは大腸菌での複製は可能だが、昆虫細胞等では複製はできない。従って、大腸菌で大量に複製してから昆虫細胞等により発現させることが好ましい。この方法によると動物細胞の場合より発現物質を大量に回収することができる。

このようにして、作製した発現プラスミドを適当な宿主細胞、例えば、大腸菌若しくは酵母等の微生物細胞、又は動物細胞などへ導入することにより、本発明の形質転換体を製造することができる。DNAの導入方法としては、公知の手法、例えば、塩化カルシウム処理したコンピテント細胞の利用、プロトプラスト法

、リン酸カルシウム法、又は電気せん孔法などを用いることができる。

本発明による医薬組成物は、その有効成分として、(1)配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質(特には、ヒトADAMTS-1タンパク質)、(2)ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又は(3)ADAMTSタンパク質を含む。なお、本発明の医薬組成物においては、有効成分として、公知タンパク質であるマウスADAMTS-1タンパク質を用いることもできる。本発明による医薬組成物において有効成分として使用することのできるこれらのタンパク質は、造血機能に影響を与える活性を有し、例えば、血管中に投与すると、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させる活性を有する。

本発明の医薬組成物は、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質(特には、ヒトADAMTS-1タンパク質)、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質を、それ単独で、又は好ましくは製剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物(特にはヒト)に経口投与又は非経口投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル(例えば、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、若しくはプロピレングリコール脂肪酸エステル)、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。

非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。

例えば、注射剤の調製においては、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトADAMTS-1タンパク質）、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。

また、本発明の医薬組成物は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の医薬組成物をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

本発明の医薬組成物は、これに限定されるものではないが、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトADAMTS-1タンパク質）、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質を、0.0001～99重量%、好ましくは0.01～80重量%、より好ましくは0.01～50重量%の量で含有することができる。

本発明の医薬組成物を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトADAMTS-1タンパク質）、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質量として通常成人1人当たり0.0001 $\mu$ g/kg～10,000 $\mu$ g/kg、好ましくは0.001 $\mu$ g/kg～1,000 $\mu$ g/kg、より好ましくは0.01 $\mu$ g/kg～100 $\mu$ g/kg程度を、1日1～4回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。

更に、用途も医薬品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能である。すなわち、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒト

ADAMTS-1タンパク質)、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質を、公知の食品添加剤と共に機能性食品や健康食品の形で与えるか、あるいは、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質(特には、ヒトADAMTS-1タンパク質)、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質自体を食品添加剤として公知の食品に含有させることも可能である。

本発明の医薬組成物は、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質(特には、ヒトADAMTS-1タンパク質)、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質を含有するので、例えば、白血球減少剤、血小板減少剤、又は赤血球増加剤として有用である。

一般に、炎症時には、白血球が血液中に動員され、炎症部位に移行し、病態を進展/発症することが知られているので、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質は、各種炎症疾患[例えば、リウマチ性関節炎、乾癬、喘息、肝炎、川崎病、痛風、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、クローン病、潰瘍性大腸炎、敗血症、又は腎炎など]の治療に有効であると考えられる。また、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質には、血小板数及び白血球数を減少させる作用があるので、例えば、真性多血症の治療に有効である。また、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質には血小板数を減少させる作用があることから、本発明のヒトADAMTS-1タンパク質が抗血栓作用を有することが予想され、例えば、心筋梗塞、脳梗塞、又は多臓器不全の治療にも有効であると考えられる。更には、ヒトADAMTS-1タンパク質には有意に赤血球数を上昇させる作用があることから、エリスロポエチンのように、貧血の治療にも有効であると考えられる。

免疫系刺激物質であるリポ多糖体(LPS;例えば、 $10\mu\text{g}$ /マウス)をマウスに投与すると、マウスADAMTS-1遺伝子の発現が、心臓及び腎臓において超誘導される[J. Biol. Chem., 272, 556-562 (1997)]ことから、マウスADAMTS-1タンパク質は、致死的な急性炎症時(例えば、エンドトキシンショック)に、心臓及び腎臓に対して防衛的に(protective)に機能している可能性がある。

トロンボスポンジン(TSP)は、内皮細胞増殖を特異的に抑制する血管新生



抑制因子として知られており [J. Cell. Biol., 111, 765-772 (1990)]、TSP遺伝子を導入した癌細胞において、癌細胞の増殖・転移を抑制することが可能であるとの報告 [Cancer. Res., 54, 6504-6511 (1994)] がなされていることから、ヒトADAMTS-1タンパク質も、制癌作用や癌転移抑制作用を示す可能性がある。また、TSPやディスインテグリンは骨代謝にも関与するとの最近の報告 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 213, 1017-1025 (1995)] から、ヒトADAMTS-1タンパク質の骨粗鬆症などの代謝性骨疾患治療への応用も考えられる。

本発明の免疫反応性物質は、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質（特には、ヒトADAMTS-1タンパク質）、ヒトADAMTS-1タンパク質改変体、又はADAMTSタンパク質と特異的に反応する。本発明の免疫反応性物質には、例えば、抗体（モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体）、これらの抗体のフラグメント [例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、又はFv等]、又は抗血清などが含まれる。本発明の免疫反応性物質は、ヒトADAMTS-1タンパク質と特異的に反応するので、ヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法の試薬として有用である。

本発明のモノクローナル抗体は、従来公知の方法、例えば、次のようにして調製することができる。

抗原を含む生理食塩水を等量のフロイント氏完全アジュバンド若しくは不完全アジュバンド、又はその等価物、例えば、Hunter's TiterMax<sup>TM</sup>（フナコシ；Cat. No. YT001-00，東京，日本）と乳化混合して、常用する骨髓腫細胞との適性を考慮して選択された哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、又はハムスターなど）、特にはマウス（例えば、BALB/cマウス）の皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、又は皮内等のいずれかに投与する（初回免疫）。以後、2～4週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫を抗原液のみで行い、最終免疫から数日後に哺乳動物から脾臓を無菌的に取り出し、脾細胞を調製する。

この脾細胞を用いて、細胞融合を行う。細胞融合のもう一方の親細胞である骨

髄腫細胞は公知の細胞株、例えば、P3X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)]、P3X63-Ag8U1 (P3U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、P3X63Ag8.653 (ATCC受託番号: CRL-1580) などを使用することができる。

細胞融合は、公知の方法に従い、例えば、ミルシュタインらの方法 [Methods in Enzymology, 73, 3-47 (1981)] 等に行うことができる。得られたハイブリドーマを移植した哺乳動物（例えば、マウス）の腹水から目的とするモノクローナル抗体を分離精製する。分離精製には、公知の方法、例えば、硫酸アンモニウムによる透析イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA若しくはプロテインG結合多糖類担体若しくは抗マウスイムノグロブリン抗体結合多糖類担体を用いた親和性カラムクロマトグラフィー、透析、又は凍結乾燥などを用いることができる。

また、本発明のポリクローナル抗体は、従来公知の方法、例えば、以下に示す方法により調製することができる。すなわち、抗原を含む生理食塩水を等量のフロイント氏完全アジュバンド若しくは不完全アジュバンド、又はその等価物、例えば、Hunter's TiterMax™ (フナコシ; Cat. No. YT001-00, 東京, 日本) と乳化混合して、哺乳動物、特にはウサギ、又はヤギ等の皮下、腹腔内、又は筋肉内などのいずれかに投与する（初回免疫）。以後、2～4週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から1～2週間後に哺乳動物の頸動脈又は心臓から血液を採取して血清を硫酸アンモニウムによって塩析することにより調製することができる。

本発明の抗体フラグメントは、例えば、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素によって消化し、続いて、タンパク質の分離・精製の常法に従って得ることができる。

免疫機能刺激物質であるLPSなどによりヒトADAMTS-1タンパク質の産生が亢進されることなどから、ヒトADAMTS-1タンパク質を、免疫状態の体外検出方法において免疫状態の診断マーカーと利用することができる。すなわち、被検対象者から採取した被検試料に関して、本発明の体外検出方法を適用

することによって、その被検対象者の生体防御系が、種々の疾病、例えば、炎症、癌、悪疫質（例えば、癌悪疫質若しくは感染症性悪疫質など）、感染症、又は白血病などにより変化している場合には、その生体防御系に相当する免疫状態を検出することができる。一方、前記被検対象者の生体防御系が正常である場合には、その生体防御系に相当する免疫状態を検出することができる。

本発明において用いることのできる被検試料としては、ヒトADAMTS-1タンパク質が含まれている可能性があれば特に限定されるものではなく、生物学的試料、例えば、ヒト（特には患者）から採取した細胞等の組織若しくはその抽出物、又は血液（例えば、血清又は血漿）、尿、若しくは脳脊髄液等の体液などを例示することができる。また、通常の臨床検査等における被検試料であれば、特に限定されず、使用することが可能である。

被検試料中におけるヒトADAMTS-1タンパク質の分析工程では、まず最初に、前記の被検試料を、ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応性のある免疫反応性物質と接触させる。この際に、もし被検試料内にヒトADAMTS-1タンパク質が存在しなければ、前記免疫反応性物質との反応が生じないが、もし被検試料内にヒトADAMTS-1タンパク質が存在すると、そのヒトADAMTS-1タンパク質と前記の免疫反応性物質とが結合して、ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫反応性物質との結合体が、ヒトADAMTS-1タンパク質の存在量に応じて生成する。この結合体は、公知の方法によって簡単に検出することができるので、結合体の存在や量から前記被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質の存在を検出したり、その量を測定することができる。被検試料として組織切片又は細胞を用い、蛍光抗体法又は酵素抗体法により、組織又は細胞中のヒトADAMTS-1タンパク質を測定することも可能である。

ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質としては、例えば、抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗血清、抗ヒトADAMTS-1タンパク質ポリクローナル抗体、若しくは抗ヒトADAMTS-1タンパク質モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント等が挙げられる。これらは単独でも、また組み合わせて同時に用いることもできる。前記抗体フラグメントには、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、又はFv等

が含まれる。

本発明のヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法では、被検試料と、ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質とを接触させ、ヒトADAMTS-1タンパク質-免疫反応性物質結合体を生成させる。そして、免疫化学的測定法により、抗体に結合したヒトADAMTS-1タンパク質を検出し、その量を測定することによって、被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質レベルを知ることができる。

免疫化学的測定法としては、原則的には、すべての慣用のイムノアッセイ、例えば、EIA法、ELISA法、又はRIA法等を用いることができる。これらの免疫化学的測定法は、一般に次の方法に大別することができる。

(1) 競合法：未知量の抗原を含む被検試料と標識剤で標識した抗原の一定量とを対応する抗体の一定量に対して競合反応させ、抗体と結合した標識抗原又は抗体と結合しなかった標識抗原の活性を測定する。

(2) サンドイッチ法：未知量の抗原を含む被検試料に、担体上に保持された過剰量の抗体を加えて反応させ（第1反応）、次に標識剤で標識した過剰量の抗体の一定量を加えて反応させる（第2反応）。担体上に保持された標識抗体又は担体上に保持されなかった標識抗体の活性を測定する。第1反応及び第2反応は同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。

標識剤が放射性同位元素である場合には、ウェルカウンター又は液体シンチレーションカウンターで測定することができる。標識剤が酵素である場合には、基質を加えて放置し、比色法又は蛍光法で酵素活性を測定することができる。標識剤が蛍光物質や発光物質であっても、それぞれ公知の方法に従って測定することができる。

上記の方法以外に、最近では、電気泳動したタンパク質をニトロセルロース等のフィルターに移し、抗体を用いて目的のタンパク質を検出する、ウェスタンブロット法が行われるようになってきたが、本発明におけるヒトADAMTS-1タンパク質の検出にももちろん利用することができる。

これらの測定法において用いる抗体は、公知の抗体標識法によって標識することができ、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、又は発光性物質等の適当

なマーカーで標識しておくことができる。

放射性同位元素としては、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、又は $^{35}\text{S}$ などを用いることができる。

酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、グリコシダーゼ（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $\beta$ -フルクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、若しくは $\alpha$ -マンノシダーゼ）、アミラーゼ（例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルコアミラーゼ、若しくはタカアミラーゼ）、セルラーゼ、若しくはリゾチーム等のカルボヒドラーゼ；ウレアーゼ、若しくはアスパラギナーゼ等のアミダーゼ；コリンエステラーゼ（例、アセチルコリンエステラーゼ）、ホスファターゼ（例、アルカリホスファターゼ）、スルファターゼ、若しくはリパーゼ等のエステラーゼ；デオキシリボヌクレアーゼ、若しくはリボヌクレアーゼ等のヌクレアーゼ；カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、若しくはチトクロームオキシダーゼ等の鉄・ポルフィリン酵素；チロシナーゼ、若しくはアスコルビン酸オキシダーゼ等の銅酵素；又はアルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、若しくはイソクエン酸脱水素酵素等の脱水素酵素などを用いることができる。

蛍光物質としてはフルオレスカミン、又はフルオレッセンスイソチオシアネートなどを、発光性物質としてはルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、又はルシゲニンなどをそれぞれ挙げるることができる。

前記の各種標識からの信号の検出は、それ自体公知の方法で実施することができる。

また、抗体と標識剤とを結合させる方法としては、任意の常法、例えば、クロラミンT法 [Nature, 194, 495-496, (1962)]、過ヨウ素酸法 [Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091, (1974)]、又はマレイミド法 [Journal of Biochemistry, 79, 233-236, (1976)] などを用いることができる。

上記測定方法のうち、例えば、EIA法は次のように行うことができる。まず

、担体（例えば、アッセイプレート）上に固定された第1抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体に被検試料を加え、ヒトADAMTS-1タンパク質と抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に酵素標識剤（例えばペルオキシダーゼ）を結合させた第2抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体を加え、前記結合体に第2抗体を更に結合させ、「第1抗体-ヒトADAMTS-1タンパク質-第2抗体」結合体を生成させる。得られた「第1抗体-ヒトADAMTS-1タンパク質-第2抗体」結合体に、前記標識酵素（ペルオキシダーゼ）の基質を加え、酵素反応による生成物の吸光度又は蛍光強度を測定することにより前記の「第1抗体-ヒトADAMTS-1タンパク質-第2抗体」結合体に付着する標識酵素の酵素活性を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトADAMTS-1タンパク質と吸光度又は蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む被検試料について得られた吸光度又は蛍光強度を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質の量を測定することができる。

また、以下に示す方法によってEIA法を行うこともできる。すなわち、まず、担体（例えば、アッセイプレート）と被検試料とを接触することにより、被検試料内のヒトADAMTS-1タンパク質を担体上に固定させ、続いて抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体（1次抗体）を加え、ヒトADAMTS-1タンパク質と1次抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に酵素標識剤（例えばペルオキシダーゼ）を結合させた抗1次抗体抗体（2次抗体）を加え前記結合体に2次抗体を結合させ、「ヒトADAMTS-1タンパク質-1次抗体-2次抗体」結合体を生成させる。得られた「ヒトADAMTS-1タンパク質-1次抗体-2次抗体」結合体に、前記標識酵素（ペルオキシダーゼ）の基質を加え、酵素反応による生成物の吸光度、又は蛍光強度を測定することにより、前記の「ヒトADAMTS-1タンパク質-1次抗体-2次抗体」結合体に付着する標識酵素の酵素活性を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトADAMTS-1タンパク質と吸光度又は蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。そ

して、未知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む被検試料について得られた吸光度又は蛍光強度を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質の量を測定することができる。

また、RIA法は、例えば、次のようにして行うことができる。まず、担体（例えば、試験管）に固定された第1抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体に被検試料を加え、ヒトADAMTS-1タンパク質と抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に放射性同位元素標識剤（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）で標識された第2抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体を加え、前記結合体に第2抗体を更に結合させ、「第1抗体-ヒトADAMTS-1タンパク質-第2抗体」結合体を生成させる。得られた「第1抗体-ヒトADAMTS-1タンパク質-第2抗体」結合体の放射能活性（例えば、 $\gamma$ -放射能活性）を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含有する標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトADAMTS-1タンパク質と放射能活性との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む被検試料について得られた放射能活性を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質の量を測定することができる。

また、以下に示す方法によってRIA法を行うこともできる。すなわち、まず、担体（例えば、試験管）と被検試料とを接触させて被検試料内のヒトADAMTS-1タンパク質を前記担体上に固定させ、続いて抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗体（1次抗体）を加えてヒトADAMTS-1タンパク質と1次抗体とを結合させて結合体を生成させ、この結合体に放射性同位元素標識剤（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）を結合させた抗1次抗体抗体（2次抗体）を加えて前記結合体に2次抗体を結合させ、「ヒトADAMTS-1タンパク質-1次抗体-2次抗体」結合体を生成させる。そして、得られた「ヒトADAMTS-1タンパク質-1次抗体-2次抗体」の放射能活性（例えば、 $\gamma$ -放射能活性）を測定する。上記の一連の操作を既知量のヒトADAMTS-1タンパク質を含む標準溶液に関して予め実施しておき、ヒトADAMTS-1タンパク質と放射能活性との関係を標準曲線として作成しておく。そして、未知量のヒトADAMTS-1タンパク質

を含む被検試料について得られた放射能活性を標準曲線にあてはめ、被検試料中のヒトADAMTS-1タンパク質の量を測定することができる。

被検試料中におけるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの分析では、被検試料と、ヒトADAMTS-1タンパク質mRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドとを反応させ、生成するヒトADAMTS-1タンパク質mRNA-ポリヌクレオチド結合体の存在を検出、又はその量を測定することにより、ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAを分析することができる。

上記ポリヌクレオチドは、選択された遺伝子（DNA）から転写されたmRNAの一部と相補的な又は実質的に相補的な配列を含み、標的遺伝子から転写されたmRNAとの間で二重鎖を形成する。その標的mRNAと安定な複合体を形成するために十分な相補性を有するいずれのポリヌクレオチドも適当であると考えられる。本発明に用いることのできるポリヌクレオチドは、実質的に標的mRNA内のどの領域の範囲で相補的であってもよい。ポリヌクレオチド分子は、ヒトADAMTS-1タンパク質遺伝子に特異的なmRNA発現の増減を検出するDNAプローブとして用いることができる。すなわち、標的であるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAに特異的に付着し、分子ハイブリッドを形成することにより、細胞内のヒトADAMTS-1タンパク質の発現の程度を検出することができる。

本発明で用いることのできるポリヌクレオチドは、標的ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの特異的塩基配列と相補的な塩基配列を適宜選択し、例えば、公知のDNA合成装置、PCR装置、又は遺伝子クローニング等を用いて調製することができる。種々の長さのポリヌクレオチドを使用することができるが、好ましくは10塩基以上、より好ましくは17塩基以上を有するものが好適である。

前記のポリヌクレオチドは、修飾されていないポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド類似体であることができる。適当な類似体として、例えば、エチルー又はメチルホスホネート類似体、ホスホロチオエート修飾されたポリデオキシヌクレオチド [Nucleic Acids Res., 14, 9081-9093



, (1986); J. Am. Chem. Soc., 106, 6077-6079, (1984)] 等が挙げられる。更に、近年のポリヌクレオチド類似体の製造における進歩により、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド [Nucleic Acids Res., 15, 6131-6148, (1987)] 又は複合RNA-DNA類似体であるキメラポリヌクレオチド [FEBS Lett., 215, 327-330, (1987)] 等も使用することができる。

選択されたポリヌクレオチドは、電荷をもつもの、又は電荷をもたないものを含め、いかなる種類のものでよい。in vitro又はin vivoでこのような実験を行うために、ポリヌクレオチドを公知の標識剤、例えば、放射性同位元素又は蛍光物質等で常法によって標識することができる。放射性同位元素としては、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、又は $^{35}\text{S}$ 等がある。なかでも、放射性同位元素としてランダムプライマー法 [Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)] を用いて $^{32}\text{P}$ で標識するのが好適である。また、より容易で危険性の少ない取扱が可能なものとして誘導体形成した蛍光色素が挙げられる。蛍光色素としては、ポリヌクレオチドと結合するすべての色素を用いることができるが、例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD)、クマリン、フルオレサミン、スクシニルフルオレセイン、又はダンシル等が好適に用いられる。

例えば、ヒトADAMTS-1タンパク質のcDNAを用いたノーザンブロット解析によるヒトADAMTS-1タンパク質mRNA量の測定は、以下のように行うことができる。すなわち、任意の体細胞又は組織からmRNAを抽出、単離し、単離したmRNAをアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース又はナイロンメンブランに転写した後、標識ヒトADAMTS-1タンパク質cDNAプローブと反応させることにより、ヒトADAMTS-1タンパク質mRNA量を測定する。使用するヒトADAMTS-1タンパク質cDNAプローブは、ヒトADAMTS-1タンパク質mRNAに相補的なDNAであり、17塩基以上の長さをもつことが望ましい。

本発明の免疫状態の分析試薬は、主要成分として、ヒトADAMTS-1タン

パク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質を含む。ヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質としては、例えば、抗ヒトADAMTS-1タンパク質抗血清、抗ヒトADAMTS-1タンパク質ポリクローナル抗体、若しくは抗ヒトADAMTS-1タンパク質モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント等が挙げられる。

また、本発明の免疫状態分析試薬は、主要成分として、前記免疫反応性物質の代わりに、ヒトADAMTS-1タンパク質mRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む構成とすることもできる。

本発明の免疫状態分析試薬を用いることにより、これまで述べてきた方法に従って、被検試料中におけるヒトADAMTS-1タンパク質それ自体、又はヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAを分析し、その結果から、種々の疾病により生体防御系が変化した被験対象の免疫状態を判定することができる。

## 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

### 実施例1：ヒトADAMTS-1 cDNAの単離及び塩基配列の決定

PCR法用のプライマーとして、マウスADAMTS-1タンパク質 [J. Biol. Chem., 272, 556-562 (1997)] における3個のトロンボスポンジン (TSP) ドメインの内、N末端から1番目のTSPドメイン中のアミノ酸配列 (配列表の配列番号3の配列: Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Tyr Thr) に対応する塩基配列 (配列表の配列番号4の配列: AGAACCTGTG GTGGTGAGT TCAATACACA) からなるDNA [以下、フォワードプライマー (1) と称する] と、マウスADAMTS-1タンパク質のC末端のアミノ酸をコードする塩基配列及びその周辺 (すなわち、上流側及び下流側領域) の塩基配列に相補的な塩基配列 (配列表の配列番号5の配列: CCTCTTAAGT GCACTGTGTC AGTGTGCAAA AG) からなるDNA [以下、バックプライマー (1) と称する] を化学合成した。

0.5  $\mu$ Mフォワードプライマー (1)、0.5  $\mu$ Mバックプライマー (1)

、0.5ユニットTaqポリメラーゼ（Ex Taqポリメラーゼ；宝酒造，京都，日本）、40  $\mu$ M-4 dNTP、及びPCR緩衝液〔組成：10 mMトリス-HCl（pH 8.3）、50 mM-KCl〕（Ex Taqバッファー；宝酒造，京都，日本）を含む溶液99  $\mu$ lに、鋳型DNAとしてヒト腎臓cDNAライブラリー（Marathon-Ready cDNA；Clontech Lab. Inc.，パロアルト，カリフォルニア州，米国）1  $\mu$ lを加え、通常のPCR法に比べて低いアニーリング温度でPCR法を実施した。すなわち、変性工程を94℃で30秒間実施し、アニーリング工程を50℃で30秒間実施し、DNA合成工程を72℃で2分間実施するサイクルを、40サイクル実施した。

得られた反応液から5  $\mu$ lを取り出し、アガロースゲル（1%）電気泳動を行ったところ、図1に示すように、1.2 Kbの単一のDNAバンドを認めた。残りの反応液を再泳動し、1.2 KbのDNA断片（以下、Flag. 1 DNA断片と称する）を低融点アガロースゲルから回収し、pCR<sup>TM</sup>2.1ベクター（Invitrogen Corp.，サンディエゴ，カリフォルニア州，米国）にクローニングした。

オートマチックDNAシーケンサー（DSQ1000；島津製作所，京都，日本）により、クローニングしたFlag. 1 DNA断片の塩基配列の一部（303 bp）を決定し、マウスADAMTS-1に対してホモロジー検索を実施した結果、77.4%の相同性が認められた。Flag. 1 DNA断片の部分塩基配列、及びその配列と相同性が認められるマウスADAMTS-1遺伝子の部分塩基配列を図2に示す。図2において、「:」は、Flag. 1 DNA断片とマウスADAMTS-1遺伝子との間で、対応する塩基が一致することを表わす。

更に、ランダムプライムドDNA-ラベリングキット（Boehringer Mannheim GmbH，ドイツ）を用いて<sup>32</sup>PでラベルしたマウスADAMTS-1 cDNAが、前記Flag. 1 DNA断片にハイブリダイズすることを、ドットハイブリダイゼーション法〔Biochemistry, 16, 4743-4749（1977）〕により確認した。結果を図3に示す。コントロールであるpCR<sup>TM</sup>2.1ベクターには、<sup>32</sup>PでラベルしたマウスADAMTS-1 cDNAがハイブリダイズしなかったのに対して、マウスADAMTS-1

cDNA及びFlag. 1 DNA断片には、 $^{32}\text{P}$ でラベルしたマウスADAMTS-1 cDNAがハイブリダイズした。

以上のホモロジー検索及びドットハイブリダイゼーションの結果から、このFlag. 1 DNA断片がヒトADAMTS-1の一部であることが判明した。

前記Flag. 1 DNA断片の上流のDNA断片を得るために、マラソンcDNA増幅キット (Marathon cDNA Amplification kit; Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国) を用いて、RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法を以下のように実施した。

Flag. 1 DNA断片の塩基配列に関するバックプライマーとして、Flag. 1 DNA断片の3' 末端領域の塩基配列に相補的な塩基配列 (配列表の配列番号6の配列: CCTCTTAAGT GCACTGTGTC AGT) からなるDNA (以下、GSP-1プライマーと称する) と、Flag. 1 DNA断片の5' 側の塩基配列に相補的な塩基配列 (配列表の配列番号7の配列: CAGGCCCACT CCCAAAGGAA GCTT) からなるDNA (以下、GSP-2プライマーと称する) とを化学合成した。

また、フォワードプライマーとしては、前記キットに含まれるAP1プライマー及びAP2プライマーをそれぞれ使用した。AP1プライマーの塩基配列は、配列表の配列番号8の配列:

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

で表わされる塩基配列であり、AP2プライマーの塩基配列は、配列表の配列番号9の配列:

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

で表わされる塩基配列である。

ヒト腎臓cDNAライブラリー (Marathon-Ready cDNA; Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国)  $5\mu\text{l}$ 、AP1プライマー  $1\mu\text{l}$ 、GSP-1プライマー ( $10\mu\text{M}$ )  $1\mu\text{l}$ 、Taqポリメラーゼ (Ex Taqポリメラーゼ) ( $0.5$  ユニット)  $1\mu\text{l}$ 、抗Taqポリメラーゼ抗体 (Taq Start Antibody; Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国)  $1\mu\text{l}$ 、

10倍濃度PCRバッファー〔組成：100mMトリス-HCl（pH8.3）、500mM-KCl〕（Clontech Lab. Inc.，パロアルト，カリフォルニア州，米国）5 $\mu$ l、及び蒸留水36 $\mu$ lを混合し、PCR反応を実施した。前記PCR反応は、94℃で30秒間の工程と68℃で4分間とからなるサイクルを35サイクル実施した。得られた反応液を10mMトリシン-EDTAバッファー（Clontech Lab. Inc.，パロアルト，カリフォルニア州，米国）で50倍に希釈した。

続いて、前記希釈液5 $\mu$ l、AP2プライマー1 $\mu$ l、GSP-2プライマー（10 $\mu$ M）1 $\mu$ l、Taqポリメラーゼ（Ex Taqポリメラーゼ）（0.5ユニット）1 $\mu$ l、抗Taqポリメラーゼ抗体（Taq Start Antibody）1 $\mu$ l、10倍濃度PCRバッファー（Clontech Lab. Inc.，パロアルト，カリフォルニア州，米国）5 $\mu$ l、及び蒸留水36 $\mu$ lを混合し、PCR反応を実施した。前記PCR反応は、94℃で30秒間の工程と68℃で4分間の工程とからなるサイクルを20サイクル実施した。

得られた反応液から5 $\mu$ lを取り出し、1%アガロースゲル電気泳動を行ったところ、図4に示すように、約1.2Kbの単一のDNAバンドを得た。常法に従って、このDNA断片（以下、Flag. 2 DNA断片と称する）をpCR™2.1ベクターにクローニングし、Flag. 2 DNA断片の全塩基配列をダイターミネーターサイクルシーケンス（Dye Terminator Cycle Sequencing）法（Perkin Elmer Japan，浦安，日本）により決定した。

また、Flag. 1 DNA断片についても、ダイターミネーターサイクルシーケンス（Dye Terminator Cycle Sequencing）法（Perkin Elmer Japan，浦安，日本）により全塩基配列を決定し、Flag. 1 DNA断片及びFlag. 2 DNA断片の塩基配列を統合することにより、ヒトADAMTS-1 cDNAの全塩基配列を決定した。ヒトADAMTS-1 cDNAの全塩基配列（停止コドンを含め、2184bp）は、配列表の配列番号2の配列で表わされる塩基配列であり、前記塩基配列から推定されるヒトADAMTS-1タンパク質のアミノ酸配列（アミノ酸残基72

7個)は、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列である。なお、図2に示すFlag-1 DNA断片の一部塩基配列と、配列表の配列番号2の配列で表わされるヒトADAMTS-1 cDNAの全塩基配列との間に、一部、塩基配列が一致しない箇所があるが、図2に示す前記一部塩基配列は、配列決定の途中で得られた塩基配列であり、配列表の配列番号2の配列で表わされる塩基配列が、最終的に決定したヒトADAMTS-1 cDNAの正しい塩基配列である。

ヒトADAMTS-1タンパク質は、システインに富み、C末端側領域に塩基性アミノ酸であるリジン及びアルギニンが多く分布しており、N-グリコシレーション部位(第307番目～第309番目のアミノ酸、及び第524番目～第526番目のアミノ酸)が2個存在する。

ヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子との塩基配列におけるホモロジーを図5～図9に、それぞれの塩基配列から予想されるアミノ酸配列におけるホモロジーを図10～図12に示す。

図5～図9において、「\*」は、ヒトADAMTS-1遺伝子とマウスADAMTS-1遺伝子との間で、対応する塩基が一致することを表わす。

図10～図12において、「\*」は、ヒトADAMTS-1タンパク質とマウスADAMTS-1タンパク質との間で、対応するアミノ酸残基が一致することを表わす。また、図10～図12において、「MMPドメイン」は、マトリックスメタロプロテアーゼドメインを意味し、第11番目及び第12番目のアミノ酸の間に引いた直線は、その位置からマトリックスメタロプロテアーゼドメインが始まることを表わし、「DIドメイン」は、デイスインテグリンドメインを意味し、第234番目及び第235番目のアミノ酸の間に引いた直線は、その位置からデイスインテグリンドメインが始まることを表わす。更に、図10～図12において、「TSPドメイン」は、トロンボスポンジンドメインを意味し、トロンボスポンジンドメインを構成するアミノ酸配列(3箇所)を四角形で囲んで示す。

ヒトADAMTS-1とマウスADAMTS-1とは、塩基配列において85.5%の相同性を示し、アミノ酸配列において90.1%の相同性を示し、マウ

スとヒトとの間でその配列がよく保存されているタンパク質であることが判明した。

## 実施例2：大腸菌によるヒトADAMTS-1融合タンパク質の調製

### (1) 大腸菌発現ベクターの構築

ヒトADAMTS-1タンパク質の内、MMPドメインから下流の部分すべてを含むヒトADAMTS-1部分タンパク質をコードするDNAにおいて、5'側に制限酵素Sma I切断部位を導入し、3'側に制限酵素Not I切断部位を導入するために、配列表の配列番号10の配列：

CACCCCGGGA GGAAGAAGCG ATTTGTGTCC AGCCCCCGTT ATG

で表わされる塩基配列からなるフォワードプライマー(2)及び配列表の配列番号11の配列：

GTGGCGGCCG CCCTCTTAAC TGCACTGTGT CAGTGTGCAA AA

で表わされる塩基配列からなるバックプライマー(2)を化学合成した。

フォワードプライマー(2) 5  $\mu$  l、バックプライマー(2) 5  $\mu$  l、ヒト腎臓cDNAライブラリー(Marathon-Ready cDNA; Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国) 1  $\mu$  l、Taqポリメラーゼ(Ex Taqポリメラーゼ) (0.5ユニット) 1  $\mu$  l、抗Taqポリメラーゼ抗体(Taq Start Antibody; Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国) 1  $\mu$  l、10倍濃度PCRバッファー(Clontech Lab. Inc., パロアルト, カリフォルニア州, 米国) 10  $\mu$  l、2.5mM-4dNTP(宝酒造, 京都, 日本) 8  $\mu$  l、及び蒸留水69  $\mu$  lを混合し、PCR反応を実施した。前記PCR反応は、94℃で1分間の工程、55℃で45秒間の工程、及び72℃で2分間の工程からなるサイクルを40サイクル実施した。

得られた反応液から5  $\mu$  lを取り出し、1%アガロースゲル電気泳動を行ったところ、図13に示すように、約2.2Kbの単一のDNAバンドを得た。常法に従って、約2.2KbのDNA断片をpCR<sup>TM</sup>2.1ベクターにクローニングし、得られたプラスミドを大量調製[Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)]した。大量調製したプラスミドを制限酵

素Sma I (宝酒造, 京都, 日本) 及びNot I (宝酒造, 京都, 日本) で処理することにより得られる約2.2 KbのDNA断片を、大腸菌発現ベクターpGEX-5X-1 [Infect Immun., 58, 3909-3913 (1990)] (Pharmacia Biotech, ウプサラ, スウェーデン) のSma I-Not Iサイトにクローニングした。得られた発現プラスミドをpG/ADAMTS-1と命名した。プラスミドpG/ADAMTS-1の構造を図14に模式的に示す。ADAMTS-1タンパク質は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (以下、GSTと称することがある) (分子量=約26 Kd) との融合タンパク質 (分子量=約96 Kd) として発現されると思われる。図14において、「Ori」は、複製開始点を意味し、「Amp<sup>R</sup>」は、アンピシリン耐性遺伝子を意味し、「laq I<sup>a</sup>」は、laqリプレッサーを意味する。

#### (2) 大腸菌によるGST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の発現

タンパク質分解酵素活性の低い大腸菌株BL-21 (Pharmacia Biotech, ウプサラ, スウェーデン) に、プラスミドpG/ADAMTS-1を常法 [Proc Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114 (1972)] によりトランスフォームし、そのプラスミドを保持する大腸菌クローンをアンピシリン耐性株として単離した。5つのアンピシリン耐性クローン (以下、クローン#1~クローン#5と称する) を無作為に選び、アンピシリン (100  $\mu$ g/ml) を含む2×YT培地 (トリプトン16 g, 酵母抽出物10 g, 塩化ナトリウム5 gを蒸留水1リットルに溶解して調製; pH 7.2) 2 mlに殖菌し、37℃で一晩培養した。次に、1つのクローンに対して、アンピシリン (100  $\mu$ g/ml) を含むLB培養液1800  $\mu$ lの入った試験管2本を1組とし、それぞれの試験管に一晩培養した前記培養液200  $\mu$ lを入れた。37℃で2時間培養した後に、2本1組の試験管の内、一方の試験管に発現誘導剤であるイソプロピルー $\beta$ -D-チオーガラクトピラノシド (IPTG) (宝酒造, 京都, 日本) 20  $\mu$ l (最終濃度1.0 mM) を加え、更に、37℃で2時間培養を続けた。なお、2本1組の試験管の内、残る一方は、発現誘導剤を入れないコントロールとした。

培養液1 mlをマイクロ遠心機で遠心 (14000 rpm, 1分間) すること



により菌体を集め、リン酸緩衝溶液（組成：140 mM-NaCl, 2.7 mM-KCl, 10 mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2; 以下、PBSと称する）100  $\mu\text{l}$ で懸濁した後、2×サンプルバッファー（0.25 M-トリス-HCl, 2% SDS, 3%グリセロール, 10%  $\beta$ -メルカプトエタノール, 0.01%ブロモフェノールブルー; pH 6.8）100  $\mu\text{l}$ に溶解した。得られた溶液10  $\mu\text{l}$ をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEと称する）にかけ、クマシー染色法によって目的とするタンパク質の発現誘導を確認した。

結果を図15に示す。図15において、「+」で示すレーンは、発現誘導剤であるIPTGを加えて培養した大腸菌を泳動したレーンであり、「-」で示すレーンは、発現誘導剤であるIPTGを加えずに培養した大腸菌を泳動したレーンである。いずれのクローンにおいても、「+」で示すレーンには、「GST-ADAMTS-1」で示す位置に、分子量約100 Kdのタンパク質が表われ、この分子量は、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の予想される分子量（約96 Kd）と一致した。なお、このタンパク質は、いずれのクローンにおいても、「-」で示すレーンには表われていなかった。

5種類のクローン（クローン#1～クローン#5）の内、最も高い発現量を示したクローン#2を以下の実施例に使用した。

### (3) GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の抽出・精製

クローン#2の一晩培養した培養液1 mlを2×YT培養液（100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有）100 mlに加え、37℃で培養した。600 nmにおける吸光度が約0.5になったところで、前記培養液に100 mM-IPTG 1 mlを加え、更に、2時間培養を続けた。

前記培養液を遠心（3000 rpm, 30分間）することにより、大腸菌を集菌し、得られた菌体をPBS 8 mlに懸濁した。懸濁液に、0.5 M-EDTA溶液1 mlと25 mg/mlリゾチーム溶液1 mlとを加えて、氷中に30分間静置した。更に、110  $\mu\text{l}$ のトライトンX-100を加えた後に、超音波破碎機（TAITEC, 越谷, 日本）により氷上で菌体を破碎した。破碎液を遠心（8000 rpm, 4℃, 10分間）し、得られた沈殿を1.0%トライトンX-

100含有PBS 30mlに懸濁し、再び遠心(8000rpm, 4℃, 10分間)した。

得られた沈殿を10mM-EDTA溶液2mlに懸濁し、8M尿素及び1%メルカプトエタノールを含有する50mMトリス-HClバッファー(pH 8.5) 50mlを加えた。十分に混合した後に、遠心(15000rpm, 4℃, 5分間)し、得られた上清を10mMトリス-HClバッファー(pH 8.5) 5リットルに対して4℃で透析した。透析を行った溶液を遠心(15000rpm, 4℃, 5分間)し、得られた上清を陰イオンクロマトグラフィー(Econo-Pac High Q; Bio-Rad Lab., ハーキュルス, カリフォルニア州, 米国)に吸着させた後に、0.2~0.4M塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分を、PBS 3リットルに対して透析し、続いて、グルタチオンセファロース4B(Pharmacia Biotech, ウプサラ, スウェーデン) 1mlに吸着させた[Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)]。

PBS 50mlで前記グルタチオンセファロース4Bを洗浄した後に、10mMグルタチオン溶液8mlで溶出させ[Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)]、GST検出キット(Pharmacia Biotech, ウプサラ, スウェーデン)にてGST活性の高い画分をプールした。

得られた画分の一部をSDS-PAGEにかけ、クマシー染色を行ったところ、図16に示すように、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質であることを、その分子量から確認した。大腸菌培養液100mlより目的タンパク質約1μgを抽出・精製した。

得られた融合タンパク質には、GSTとヒトADAMTS-1タンパク質との間にFactor Xa等で切断することができる部位が存在するので、前記プロテアーゼで消化することによりヒトADAMTS-1タンパク質を得ることができる。このヒトADAMTS-1タンパク質は、例えば、抗体を作製するための抗原として使用することができる。

実施例3：GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の造血機能に影響を与

### える活性の検討

GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の造血機能に影響を与える活性を検討するために、実施例2(3)に記載の方法に基づいて、大腸菌培養液3リットルからGST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の大量調製を実施し、目的タンパク質約30 $\mu$ gを得た。

GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質の造血機能に影響を与える活性として、マウス尾静脈単回投与による血球系細胞数に与える作用を検討した。この評価系は、少量の目的タンパク質で実施することが可能であり、しかも、迅速に生物活性を明らかにすることができる。コントロールとしてベクターpGEX-5X-1を導入した大腸菌から、実施例2(3)に記載の方法に基づいて抽出・精製したGSTタンパク質を用いた。

8匹のC<sub>57</sub>BL/6Nマウス(チャールスリバー, 横浜, 日本)(雄, 7週令)に、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質1 $\mu$ gを尾静脈より投与し、投与してから3時間及び24時間後に白血球、赤血球、及び血小板の数を算出した。コントロールとして、8匹のC<sub>57</sub>BL/6Nマウス(チャールスリバー, 横浜, 日本)(雄, 7週令)に、GSTタンパク質1 $\mu$ gを尾静脈より投与し、同様に、投与してから3時間及び24時間後に白血球、赤血球、及び血小板の数を算出した。結果を図17に示す。図17から明らかなように、GST-ヒトADAMTS-1融合タンパク質を投与したマウスでは、白血球及び血小板の数が、コントロールに比べて有意に低下し、赤血球の数が、コントロールに比べて有意に増加した。

### 産業上の利用可能性

本発明によるタンパク質によれば、造血機能を調節することができ、例えば、白血球及び血小板の数を低下させ、同時に、赤血球の数を増加させることができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 7 2 7

配列の型 : アミノ酸

## 配列

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser

5

10

15

Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu

20

25

30

Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val

35

40

45

Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu

50

55

60

Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu

65

70

75

80

Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln

85

90

95

Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr

100

105

110

Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp

115

120

125

Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser

130

135

140

Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala

145

150

155

160

His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln

165

170

175

Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
 180 185 190  
 Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
 195 200 205  
 Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
 210 215 220  
 Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
 245 250 255  
 Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
 260 265 270  
 Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
 275 280 275  
 Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
 290 295 300  
 Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
 325 330 335  
 Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
 340 345 350  
 Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
 355 360 365  
 Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
 370 375 380  
 Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
 385 390 395 400

Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp

405

410

415

Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val

420

425

430

Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr

435

440

445

Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile

450

455

460

Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn

465

470

475

480

Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro

485

490

495

Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu

500

505

510

Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu

515

520

525

Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr

530

535

540

Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg

545

550

555

560

Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro

565

570

575

Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu

580

585

590

Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser

595

600

605

Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly

610

615

620

Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
 625                                  630                                  635                                  640  
 Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
    645                                  650                                  655  
 Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
    660                                  665                                  670  
 Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
    675                                  680                                  685  
 Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
    690                                  695                                  700  
 His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
 705                                  710                                  715                                  720  
 Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser  
    725

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 1 8 4

配列の型 : 核酸

配列

ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC	48
Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser	
5                                  10                                  15	
CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA	96
Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu	
20                                  25                                  30	
TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG	144
Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val	
35                                  40                                  45	

GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG 192  
 Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu  
 50 55 60  
 GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA 240  
 Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu  
 65 70 75 80  
 GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG 288  
 Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln  
 85 90 95  
 AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA 336  
 Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr  
 100 105 110  
 GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT 384  
 Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp  
 115 120 125  
 ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC 432  
 Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser  
 130 135 140  
 TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC 480  
 Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala  
 145 150 155 160  
 CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG 528  
 His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
 165 170 175  
 TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA 576  
 Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
 180 185 190



ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC	624
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala	
195 200 205	
TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG	672
Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met	
210 215 220	
GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GGC GAT CTC CCT GGC ACC	720
Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr	
225 230 235 240	
TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC	768
Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser	
245 250 255	
AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC	816
Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr	
260 265 270	
GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG	864
Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp	
275 280 275	
GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG	912
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys	
290 295 300	
TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA	960
Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly	
305 310 315 320	
AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT	1008
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly	
325 330 335	

GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG 1056  
 Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
 340 345 350  
 AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CGA GTG CGC TAC AGA TCC TGT 1104  
 Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
 355 360 365  
 AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA 1152  
 Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
 370 375 380  
 CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG 1200  
 Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
 385 390 395 400  
 CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC 1248  
 Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp  
 405 410 415  
 AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT 1296  
 Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
 420 425 430  
 TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC 1344  
 Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
 435 440 445  
 TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC 1392  
 Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
 450 455 460  
 ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT 1440  
 Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
 465 470 475 480

GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT	1488
Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro	
485 490 495	
GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA	1536
Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu	
500 505 510	
GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT	1584
Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu	
515 520 525	
GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT	1632
Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr	
530 535 540	
TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG	1680
Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg	
545 550 555 560	
TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT	1728
Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro	
565 570 575	
CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT	1776
Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu	
580 585 590	
CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT	1824
Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser	
595 600 605	
TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC	1872
Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly	
610 615 620	

GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA 1920  
 Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
 625 630 635 640  
 TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG 1968  
 Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
 645 650 655  
 AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG 2016  
 Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
 660 665 670  
 CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC 2064  
 Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
 675 680 685  
 AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT 2112  
 Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
 690 695 700  
 CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT 2160  
 His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
 705 710 715 720  
 TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA 2184  
 Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser  
 725

配列番号 : 3

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

配列

Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Tyr Thr

配列番号 : 4

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

配列

AGAACCTGTG GTGGTGGAGT TCAATACACA 30

配列番号 : 5

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

配列

CCTCTTAACT GCACTGTGTC AGTGTGCAAA AG 32

配列番号 : 6

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

配列

CCTCTTAACT GCACTGTGTC AGT 23

配列番号 : 7

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

配列

CAGGCCCACT CCCAAAGGAA GCTT 24

配列番号 : 8

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

配列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC 27

配列番号 : 9

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

配列

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

配列番号 : 10

配列の長さ : 43

配列の型 : 核酸

配列

CACCCCGGGA GGAAGAAGCG ATTTGTGTCC AGCCCCCGTT ATG

43

配列番号 : 11

配列の長さ : 42

配列の型 : 核酸

配列

GTGGCGGCCG CCCTCTTAAC TGCACTGTGT CAGTGTGCAA AA

42

## 請 求 の 範 囲

## 1. 配列表の配列番号1の配列:

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser  
Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu  
Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val  
Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu  
Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu  
Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln  
Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr  
Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp  
Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser  
Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala  
His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp

Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro  
Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu  
Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu  
Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser  
Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly  
Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser

で表わされるアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質。

2. 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体。

3. マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有することを特徴とするタンパク質（但し、マウスADAMTS-1タンパク質を除く）。

4. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子。

5. 配列表の配列番号2の配列：



ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC  
CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA  
TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG  
GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG  
GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA  
GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG  
AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA  
GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT  
ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC  
TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC  
CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG  
TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA  
ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC  
TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG  
GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GGC GAT CTC CCT GGC ACC  
TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC  
AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC  
GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG  
GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG  
TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA  
AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT  
GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG  
AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CGA GTG CGC TAC AGA TCC TGT  
AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA  
CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG  
CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC  
AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT  
TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC  
TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC

ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT  
GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT  
GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA  
GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT  
GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT  
TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG  
TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT  
CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT  
CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT  
TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC  
GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA  
TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG  
AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG  
CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC  
AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT  
CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT  
TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA

で表わされる塩基配列を含む、請求項 4 に記載の遺伝子。

6. 請求項 4 又は 5 に記載の遺伝子を含むことを特徴とするベクター。

7. 請求項 6 に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

8. (1) 配列表の配列番号 1 の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、

(2) 配列表の配列番号 1 の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は

(3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質

と、製剤学的又は獣医学的に許容することのできる担体とを含むことを特徴とする医薬組成物。

9. 白血球減少剤である、請求項8に記載の医薬組成物。
10. 血小板減少剤である、請求項8に記載の医薬組成物。
11. 赤血球増加剤である、請求項8に記載の医薬組成物。
12. (1) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、
- (2) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は
- (3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質と、食品添加剤とを含むことを特徴とする食品。
13. (1) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、
- (2) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は
- (3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質を含むことを特徴とする食品添加剤。
14. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質と特異的に反応することを特徴とする免疫反応性物質。
15. 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質と、被検試料とを接触させ、ヒトADAMTS-1タンパク質と前記免疫反応性物質との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトADAMTS-1タンパク質の免疫学的分析方法。
16. 被検試料における、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質を分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法。
17. 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌク

レオチドと、被検試料とを接触させ、ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAと前記遺伝子との結合体を検出することを特徴とする、前記ヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの分析方法。

18. 被検試料における、配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAを分析することを特徴とする、免疫状態の体外検出方法。

19. 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質と免疫学的に反応することのできる免疫反応性物質を含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬。

20. 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列からなるヒトADAMTS-1タンパク質のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、免疫状態の分析試薬。

21. (1) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、

(2) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は

(3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質

を、白血球の低下に有効な量で、白血球を低下させることが必要な対象に投与することを含む、白血球の低下方法。

22. (1) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、

(2) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は

(3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質

を、血小板の低下に有効な量で、血小板を低下させることが必要な対象に投与することを含む、血小板の低下方法。

23. (1) 配列表の配列番号1の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパ

ク質、

(2) 配列表の配列番号 1 の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は

(3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質

を、赤血球の増加に有効な量で、赤血球を増加させることが必要な対象に投与することを含む、赤血球の増加方法。

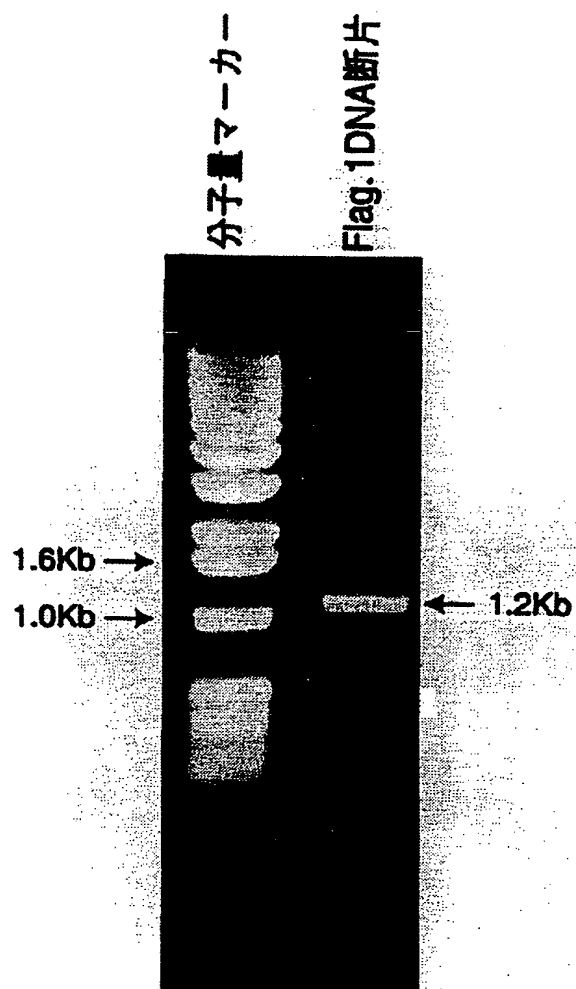
24. (1) 配列表の配列番号 1 の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、

(2) 配列表の配列番号 1 の配列で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に等価な改変体、又は

(3) マトリックスメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、及びトロンボスポンジンドメインを有するタンパク質の、医薬組成物製造への使用。

1 / 17

FIG. 1



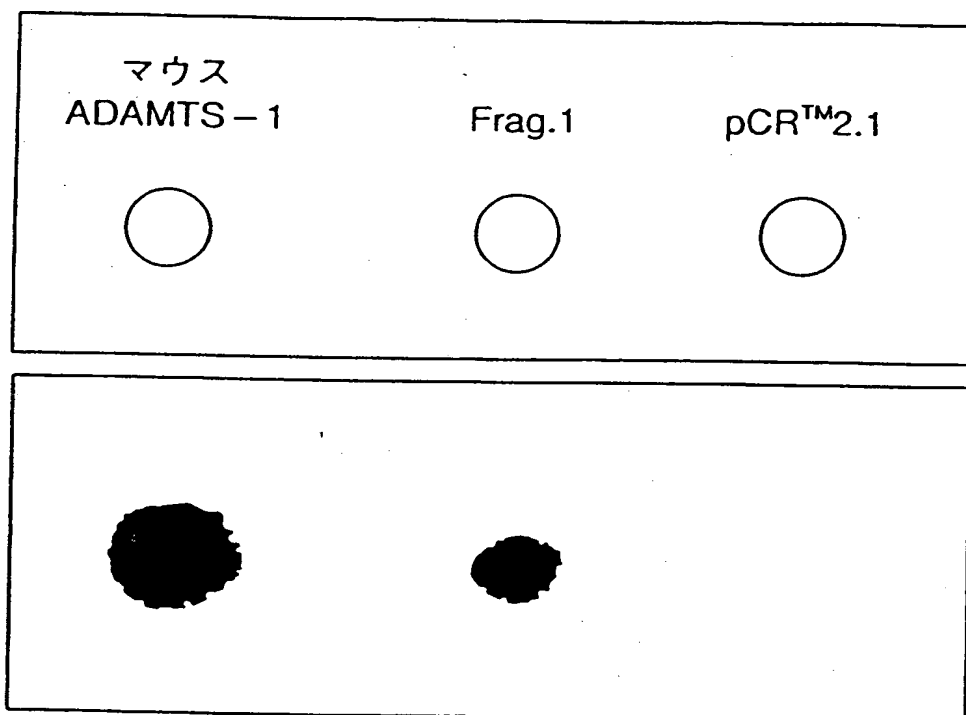
2 / 1 7

## FIG. 2

[illegible]

3 / 17

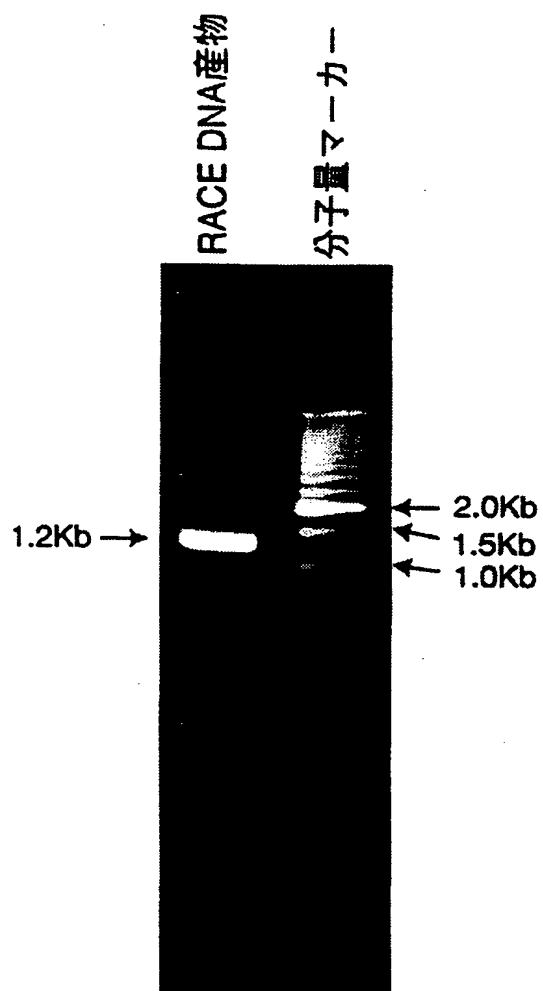
FIG. 3





4 / 17

FIG. 4



5 / 17

## FIG. 5

Hu ADAMTS-1 1' ATGGATATCTGCAGAAATTCGGCTTAGGAAGAAGCGATTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
\* \* \* \* \*  
Mu ADAMTS-1 1" AAGCCATCAGGACCAAGGAAGCATAGGAAGAAGCGATTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
\* \* \* \* \*

61' GAACCATGCTTGTGGCAGACCAGTCGATGGCAGAAATCCACGGCAGTGGTCTAAAGCAT  
\* \* \* \* \*  
61" GAACCATGCTGCTAGCTGACCAAGTCATGGCCGACTCCACGGCAGCGGTCTAAAGCAT  
\* \* \* \* \*

121' TACCTTCTCACGTTGTTTCGGTGGCAGCCAGATTGTACAAACACCCAGCATTCGTAAT  
\* \* \* \* \*  
121" TACCTTCTAACCCCTGTTCTCGGTGGCAGCCAGGTTTACAAGCATCCAGCATTAGGAAT  
\* \* \* \* \*

181' TCAGTTAGCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCATCCACGATGAACAGAAGGGCCGGAA  
\* \* \* \* \*  
181" TC AATTAGCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCATATACGAGGAGCAGAAGGACCGAGAA  
\* \* \* \* \*

241' GTGACCTCCAATGCTGCCCTCACTCTGCGGAACCTTTTGCAACTGGCAGAAGCAGCACAAAC  
\* \* \* \* \*  
241" GTTACCTCCAATGCAGCTCTCACCCCTTCGGAATTTCTGCAGCTGGCAGAAACAACAAC  
\* \* \* \* \*

301' CCACCCAGTGACCGGGATGCAGAGCACTATGACACAGCAATTCTTTTCACCAGACAGGAC  
\* \* \* \* \*  
301" AGCCCCAGTGACCGGGATCCAGAGCACTATGACACTGCAATTCTGTTCCACCAGACAGGAT  
\* \* \* \* \*

361' TTGTGTGGGTCCCAGACATGTGATACTCTTGGGATGGCTGATGTTGGAACTGTGTGTGAT  
\* \* \* \* \*  
361" TTATGTGGCTCCCACACGCTGTGACACTCTCGGAATGGCAGATGTTGGAACCGTATGTGAC  
\* \* \* \* \*

421' CCGAGCAGAAAGCTGCTCCGTCATAGAAGATGATGGTTTACAAGCTGCCCTTACCACAGGCC  
\* \* \* \* \*  
421" CCCAGCAGGAGCTGCTCAGTCATAGAAGATGATGGTTTGC AAGCTGCCCTTACCACAGGCC  
\* \* \* \* \*

6 / 17

## FIG. 6

Hu ADAMTS-1 481' CATGAATTAGGCCACGTTTAAACATGCCACATGATGCAAAAGCAGTGTGCCAGCCTT  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 481'' CATGAATTGGCCCATGTGTTAAACATGCCGCACGATGCTAAGCACGTGTGCCAGCTTG  
\*\*\*\*\*  
541' AATGGTGTGAACCAAGGATTCCACACATGATGGCGTCAATGCTTCCAAACCTGGACCCACAGC  
\*\*\*\*\*  
541'' AATGGTGTGAGTGGCGATTCTCATCTGATGGCCCTCGATGCTCTCCAGCTTAGACCATAGC  
\*\*\*\*\*  
601' CAGCCTTGGTCTCCTTGCAGTGCCTACATGATTACATCATTTCTGGATAAATGGTCAATGGG  
\*\*\*\*\*  
601'' CAGCCCTGGTCACCTTGCAGTGCCTACATGGTCAAGTCTTCTAGATAAATGGACACGGG  
\*\*\*\*\*  
661' GAATGTTTGATGGACAAGCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCCAGGCGATCTCCCTGGCACCC  
\*\*\*\*\*  
661'' GAATGTTTGATGGACAAGCCCAAGATCCCAATCAAGTCCCTTCTGATCTTCCCGGTACC  
\*\*\*\*\*  
721' TTGTACGATGCCAACCGGCAGTGCCAGTTTACATTTGGGAGGACTCCAAACACTGCCCC  
\*\*\*\*\*  
721'' TTGTACGATGCCAACCGGCAGTGTCAGTTTACATTCGGAGAGGAATCCAAGCACTGCCCT  
\*\*\*\*\*  
781' GATGCAGCCAGCACATGTAGCACCTTGTGGTGTACCGGCACCTCTGGTGGGTGCTGGTG  
\*\*\*\*\*  
781'' GATGCAGCCAGCACATGTACTACCTGTGGTGCACCTGGCACCTCCGGTGGCTTACTGGTG  
\*\*\*\*\*  
841' TGTCAAACCAAACACTTCCCGTGGCGGATGGCACCAAGCTGTGGAGAAAGGAAATGGTGT  
\*\*\*\*\*  
841'' TGCCAAACCAAACACTTCCCTTGGGCAGATGGCACCAAGCTGTGGAGAAAGGAAAGTGGTGT  
\*\*\*\*\*  
901' ATCAACGGCAAGTGTGTGAACAAACCGACAGGAAGCATTTTGATACGCCCTTTTCATGGA  
\*\*\*\*\*  
901'' GTCAGTGGCAAGTGGTGAACAAACAGACAGACATGAAGCATTTTGCTACTCCTGTTTCATGGA  
\*\*\*\*\*

7/17

## FIG. 7

Hu ADAMTS-1 961' AGCTGGGGACCATGGGGACCGTGGGGAGACTGTTCGAGAACGTGCGGTGGAGGAGTCCAG  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 961" AGCTGGGGACCATGGGGACCGTGGGGAGACTGTCTCAAGAACCTGTGGTGGGAGTTCAA  
\*\*\*\*\*  
1021' TACACGATGAGGGGAATGTGACAAACCCAGTCCCAAGAAATGGAGGGAAGTACTGTGAAGGC  
\*\*\*\*\*  
1021" TACACAAATGAGAGAAATGTGACAAACCCAGTCCCAAGAACGGAGGGAAGTACTGTGAAGGC  
\*\*\*\*\*  
1081' AACGAGTGGCGCTACAGATCCCTGTAACTTGAGGACTGTCCAGACAAATAATGGAAAAACC  
\*\*\*\*\*  
1081" AACGAGTCCGCTACAGGTCCCTGTAACTCGAGGACTGTCCAGACAAATAACGGAAAAACG  
\*\*\*\*\*  
1141' TT TAGAGAGGAACAATGTGAAGCACACACGAGTTTCAAAAGCTTCCTTTGGGAGTGGG  
\*\*\*\*\*  
1141" TTCAGAGAGGAGCAGTGCAGGCGCACAAATGAGTTTCCAAAGCTTCCTTTGGGAATGAG  
\*\*\*\*\*  
1201' CCTGGGTTGGAATGGATTCCCAAGTACGCTGGCGTCTCACCACAAAGGACAGGTGCAAGCTC  
\*\*\*\*\*  
1201" CC CACTGTAGAGTGGACACCCCAAGTACGCCGGCGTCTGCCCAAGGACAGGTGCAAGCTC  
\*\*\*\*\*  
1261' ATCTGCCAAGCCAAAGGCATTGGCTACTTCTTCGTTTTCAGGCCCAAGGTGTGTGATGGT  
\*\*\*\*\*  
1261" ACCTGTGAAGCCAAAGGCATTGGCTACTTTTCGTCTTACAGCCCAAGGTGTGTGATGGC  
\*\*\*\*\*  
1321' ACTCCATGTAGCCCGAGATTCCACCTCTGTCTGTGTGCAAGGACAGTGTGTAAAAGCTGGT  
\*\*\*\*\*  
1321" ACTCCCTGTAGTCCAGACTCTACCTCTGTCTGTGTGCAAGGCGCAGTGTGTGAAAAGCTGGC  
\*\*\*\*\*  
1381' TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAATGTGGTGTTCGCGGGGAAAT  
\*\*\*\*\*  
1381" TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAGTGTGGCGTTTGTGGAGGAAC  
\*\*\*\*\*

8 / 17

FIG. 8

Hu ADAMTS-1 1441' GGATCTACTTGTAAAAAATAATCAGGATCAGTTACTAGTGCAAAACCTGGATATCATGAT  
\*\*  
Mu ADAMTS-1 1441" GGTTCACATGCAAGAAGATGTCAGGAATAGTCACTAGTACAAGACCTGGGTATCATGAC  
\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*  
1501' ATCGTCACAAATCCAACTGGAGCCACCAACATCGAAAGTGAAACAGCGGGAACCAAGAGGGGA  
\*\* \*\* \*\* \*\*  
1501" ATGTGTCACAAATTCCTGCTGGAGCCACCAACATCGAAAGTGAAACATCGGAATCAAAGGGGG  
\*\* \*\* \*\*  
1561' TCCAGGAACAAATGGCAGCTTCTTGCCATCAAAAGCTGCTGATGGCACAATATATCTTAAAT  
\*\* \*\* \*\*  
1561" TCCAGAAACAAATGGCAGCTTCTGGCTATTAGAGCCGCTGATGGTACCTATATCTGAAT  
\*\* \*\* \*\*  
1621' GG TGACTACACTTTGTCCACCTTAGAGCAAGACATTATGTACAAAGGTGTGTTGCTTGAGG  
\*\* \*\* \*\*  
1621" GGAAACTTCACCTCTGTCCACACTAGAGCAAGACCTCACCTACAAAGGTACTGTCTTAAAG  
\*\* \*\* \*\*  
1681' TACAGCGGCTCCTCTGCGGCATTTGGAAGAAATTCGCAGCTTTAGCCCTCTCAAAGAGCCC  
\*\* \*\* \*\*  
1681" TACAGTGGTTCCCTCGGCTGCGCTGGAAGAAATCCGCAGCTTTAGTCCACTCAAAGAACCC  
\*\* \*\* \*\*  
1741' TTGACCATCCAGGTTCTTACTGTGGGCAATGCCCTTCGACCTAAAATTAAATACACCTAC  
\*\* \*\* \*\*  
1741" TTAACCATCCAGGTTCTTATGGTAGGCCATGCTCTCCGACCCAAAATTAAATTCACCTAC  
\*\* \*\* \*\*  
1801' TT CGTAAAGAAGAAGAAAGGAATCTTTCAATGCTATCCCCACTTTTTCAGCATGGGTCAAT  
\*\* \*\* \*\*  
1801" TT TATGAAGAAGAAGACAGAGTCAATCAACGCCATTCCACATTTTCTGAGTGGGTGATT  
\*\* \*\* \*\*  
1861' GAAGAGTGGGGCGGAATGTTCTAAGTCAATGTGAATTGGGTTGGCAGAGAAGACTGGTAGAA  
\*\* \*\* \*\*  
1861" GAAGAGTGGGGGAGTGCTCCAAGACATGCGGCTCAGGTTGGCAGAGAAGAGTAGTGCAG  
\*\* \*\* \*\*

9/17

## FIG. 9

Hu ADAMTS-1 1921' TGCCGAGACATTAAATGGACAGCCCTGCTTCCGAGTGTGCAAGGAAGTGAAGCCAGCCAGC  
\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 1921" TGCAGAGACATTAAACGGACACCCCTGCTTCCGAATGTGCAAGGAAGTGAAGCCAGCCAGT  
1981' ACCAGACCTTGTGCAGACCATCCCTGCCCCAGTGGCAGCTGGGGGAGTGGTCAATCATGT  
1981" ACCAGACCTTGTGCAGACCTTCCCTTGCCACACTGGCAGGTGGGGGATTGGTCAACCATGT  
2041' TCTAAGACCTGTGGGAAGGGTTACAAAAAAGAAAGCTTGAAGTGTCTGTCCCATGATGGA  
2041" TCCAAACCTTGGGGAAGGGTTACAAGAAAGAAACCTTGAAATGTGTGTCCACGATGGG  
2101' GGGGTGTTATCTCATGAGAGCTGTGATCCTTTAAAGAAACCTAAACATTTATAGACTTT  
2101" GGCCCTGTTATCAATGAGAGCTGTGATCCTTTGAAGAAAGCCAAAGCAATTACATTGACTTT  
2161' TGCACACTGACACAGTGCAGTTAA  
2161" TGCACACTGACACAGTGCAGTTAA

FIG. 10

211' ITSFLDNGHGECLMDKPQNPIQLPGDLPGT  
 \*\*\*\*\*  
 211" VTSFLDNGHGECLMDKPQNPIKLPSPDLPGT

→DIDメイン

11/17

## FIG. 11

Hu ADAMTS-1 241' LYDANRQCQFTFGEDSKHCPDAASTCSTLW  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 241" LYDANRQCQFTFGEE SKHCPDAASTCTTLW

271' CTGTSGGVLVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC  
\*\*\*\*\*  
271" CTGTSGGLLVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC

301' INGKCVNKTD RKHFDT P FHGS TSPドメイン WGPWGPWGD  
\*\*\*\*\*  
301" VSGKCVNKTD MKHFAT P VHGS WGPWGPWGD

331' CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG  
\*\*\*\*\*  
331" CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG

361' KRVRYRSCNLED CPDNNGKTFREEQCEAHN  
\*\*\*\*\*  
361" KRVRYRSCNIED CPDNNGKTFREEQCEAHN

391' EFSKASFGSGPAVEWIPKYAGVSPKDRCKL  
\*\*\*\*\*  
391" EFSKASFGNEPTVEWTPKYAGVSPKDRCKL

421' ICQAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV  
\* \*\*\*\*\*  
421" TCEAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV

451' CVQGQCVKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN  
\*\*\*\*\*  
451" CVQGQCVKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN

481' GSTCKKISGSVTSAPGYHDIVTIPTGATN  
\*\*\*\*\*  
481" GSTCKKMSGIVTSTRPGYHDIVTIPAGATN



12/17

## FIG. 12

Hu ADAMTS-1 511' IEVKQRNQRGSRNNGSFLAIKAADGTYILN  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 511" IEVKHRNQRGSRNNGSFLAIRAADGTYILN

541' GDYTLSTLEQDIMYKGVVLRYSGSSAALER  
\* \*\*\*\*\*  
541" GNFTLSTLEQDLTYKGTVLRYSGSSAALER

571' IRSFSPLKEPLTIQVLTVGNALRPKIKYTY  
\*\*\*\*\*  
571" IRSFSPLKEPLTIQVLMVGHALRPKIKFTY

TSPドメイン  
601' FVKKKKESFNAIPTFSAWVIEEWGECISKSC  
\* \* \* \* \*  
601" FMKKKTESFNAIPTFSEWVIEEWGECISKTC

631' ELGWQRRRLVECRDINGQPASECAKEVKPAS  
\* \* \* \* \*  
631" GSGWQRRRVVQCRDINGHPASECAKEVKPAS

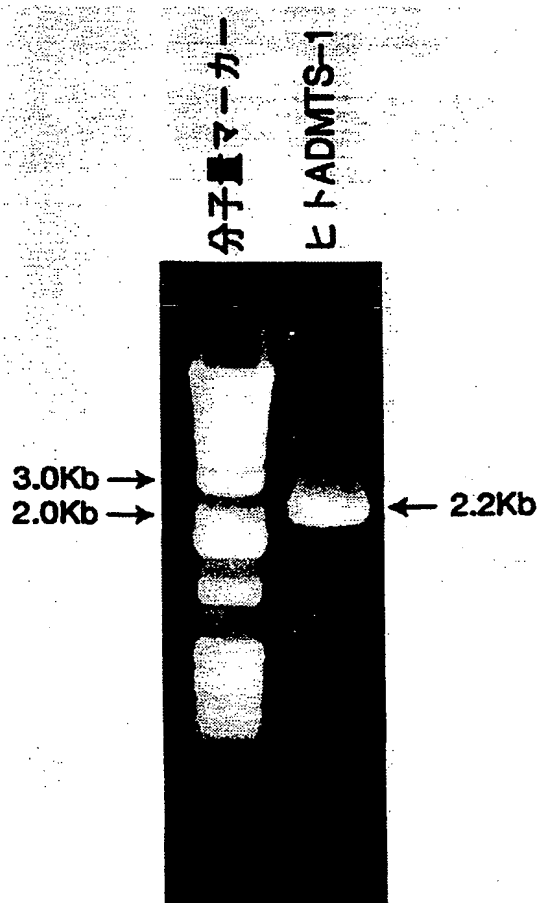
TSPドメイン  
661' TRPCADHPCPQWQLGEWSSCSKTCGKGYKK  
\* \* \* \* \*  
661" TRPCADLPCPHWQVGDWSPCSKTCGKGYKK

691' RSLKCLSHDGGVLSHESCDPLKKPKHFIDF  
\* \* \* \* \*  
691" RTLKCVSHDGGVLSNESCDPLKKPKHYIDF

721' CTLTQCS  
\* \* \* \* \*  
721" CTLTQCS

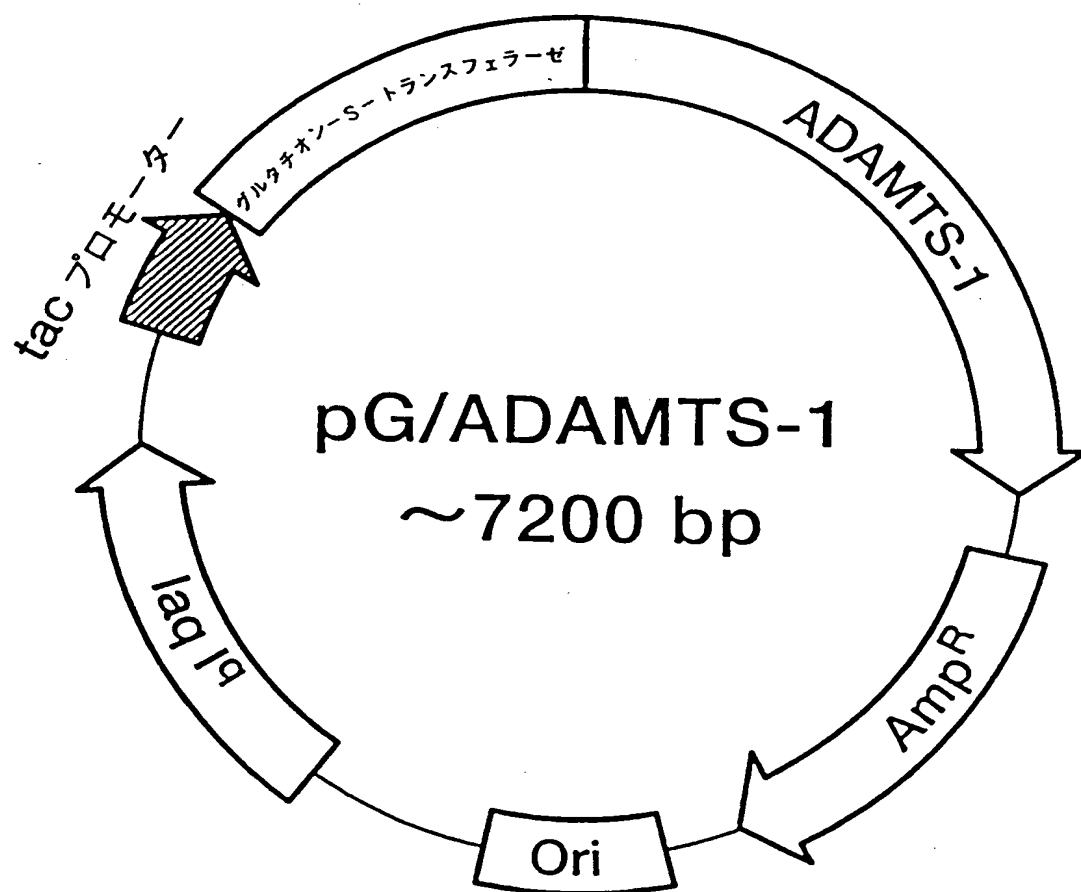
13/17

FIG. 13



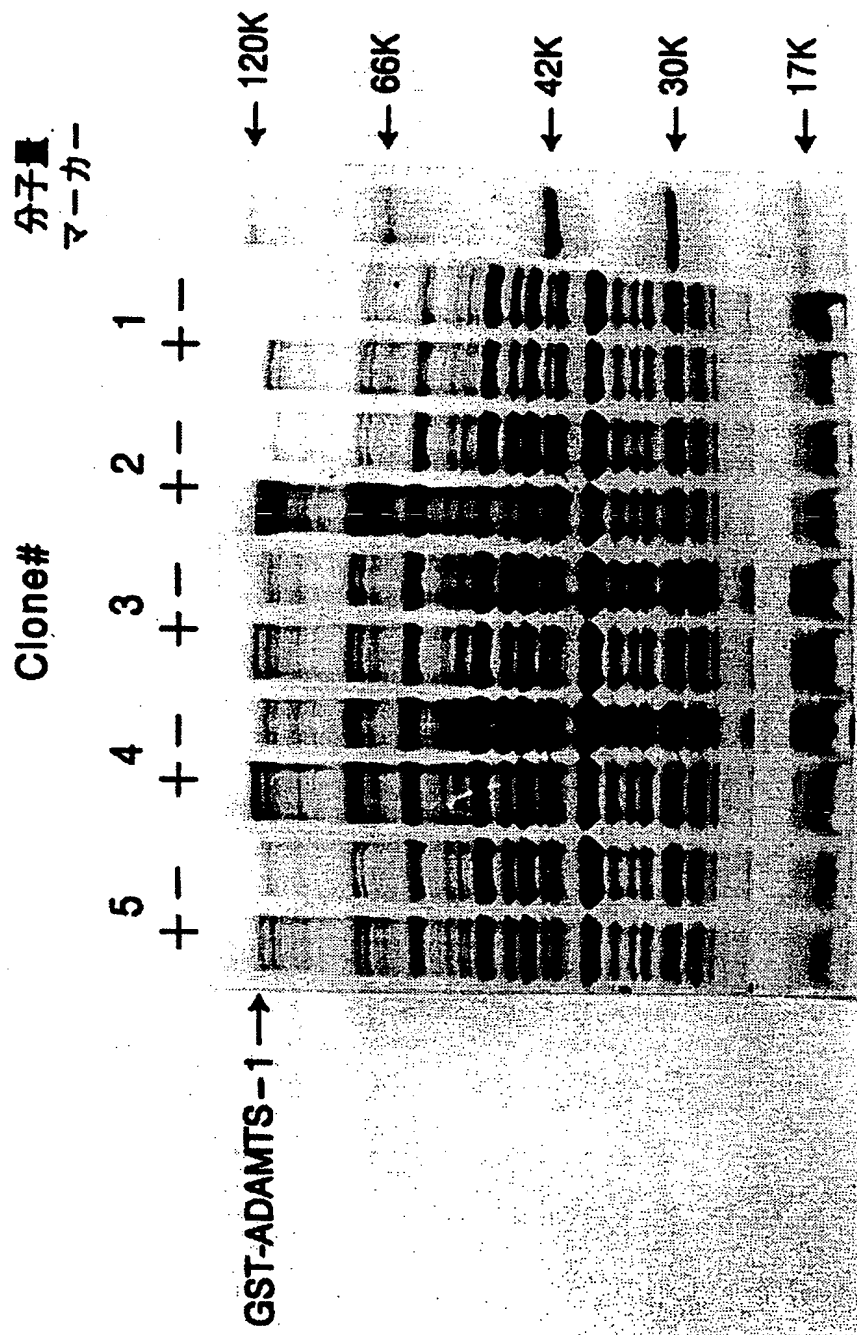
14/17

FIG. 14



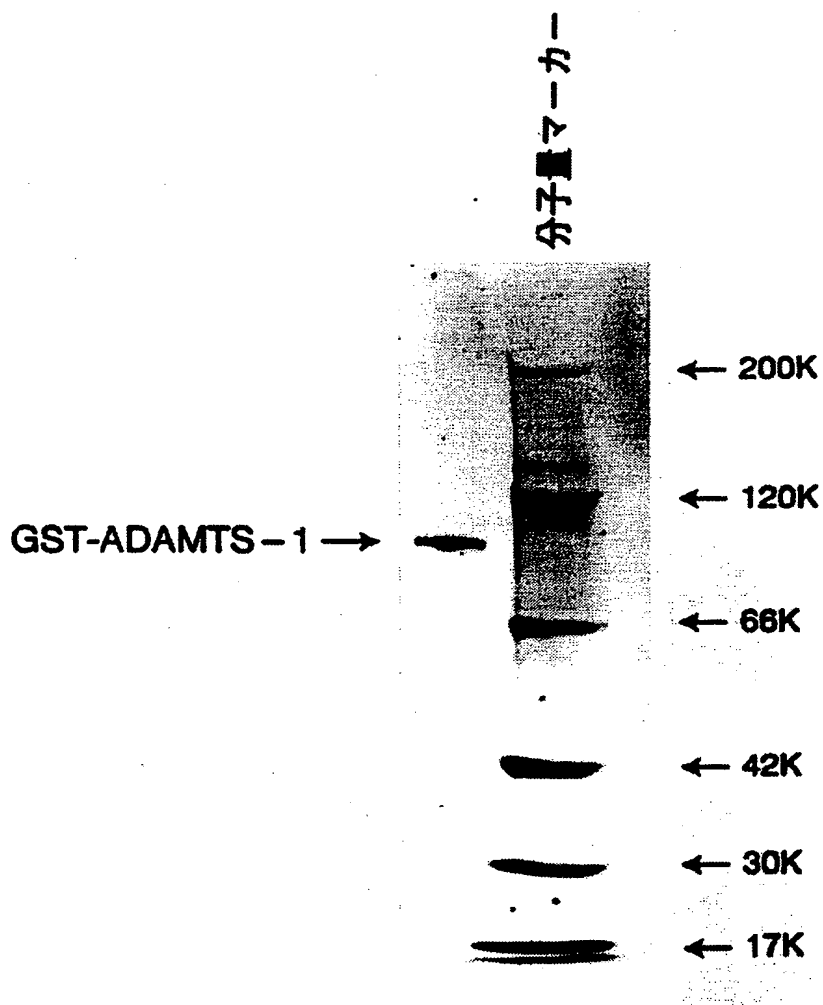
15 / 17

FIG. 15



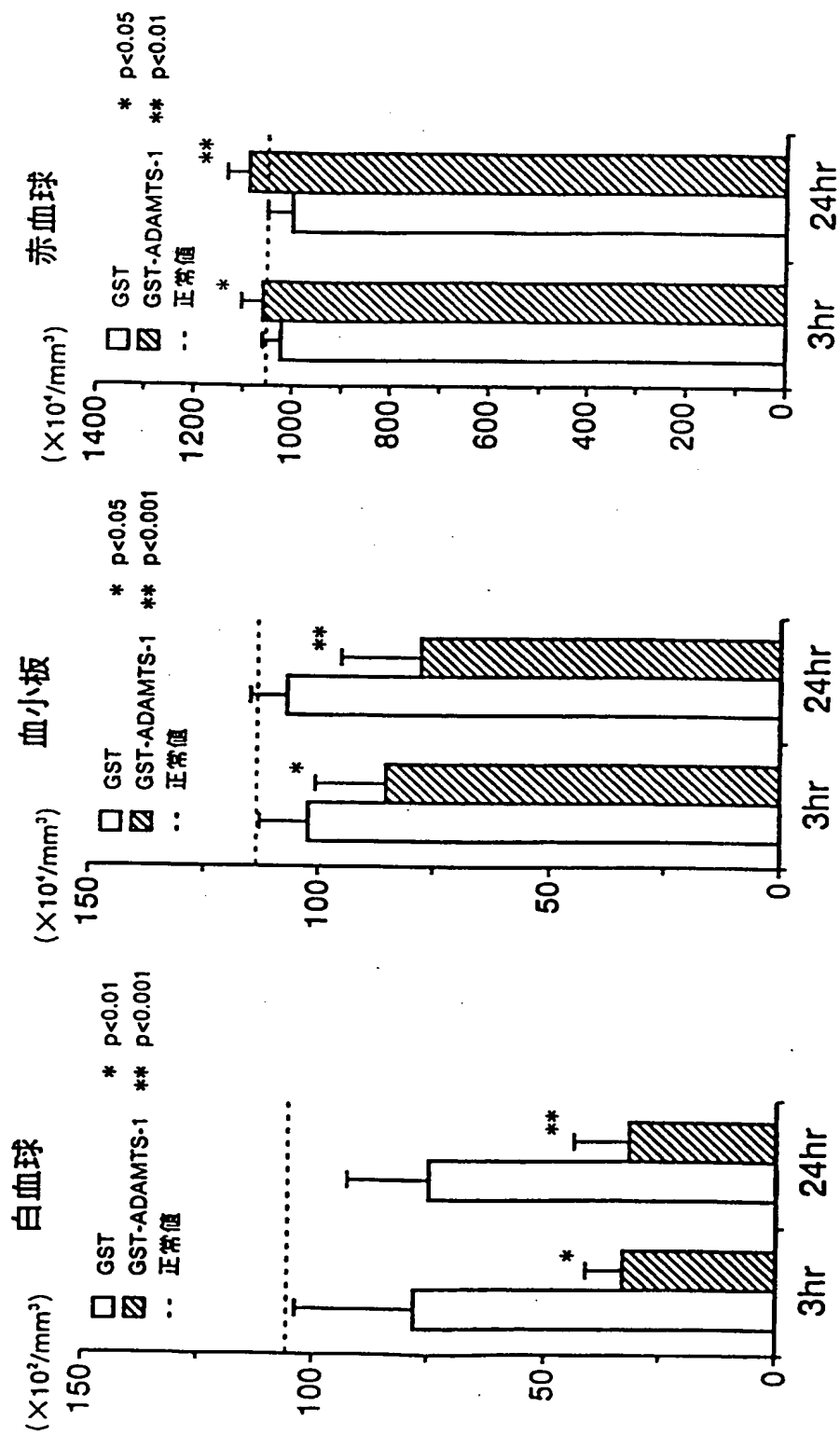
16 / 17

FIG. 16



17/17

FIG. 17



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02449

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305 // C07K14/745, C07K14/78, C07K16/18,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	The Journal of Biological Chemistry. Vol. 272 No. 1 (1997) Kouji Kuno et al., "Molecular Cloning of Gene Encoding a New Type of Metalloproteinase-disintegrin Family Protein with Thrombospondin Motifs as an Inflammation Associated Gene" p.556-562	1-20, 24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
4 September, 1998 (04. 09. 98)

Date of mailing of the international search report  
16 September, 1998 (16. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02449

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21-23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matters of claims 21 to 23 relate to a method for lowering the number of leukocytes involving administration of the protein to an object required to be reduced in the number of leukocytes, a method for reducing the number of thrombocytes involving administration of the protein in an

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark n Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02449

Continuation of Box No. I of continuation of first sheet (1)

effective amount for reducing the number of thrombocytes to an object required to be reduced in the number of thrombocytes, and a method for increasing the number of erythrocytes involving administration of the protein in an effective amount for increasing the number of erythrocytes to an object required to be reduced in the number of erythrocytes, that is, relate to methods for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02449

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00, (C12P21/02, C12R1:19)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305 // C07K14/745, C07K14/78, C07K16/18, C07K19/00, (C12P21/02, C12R1:19)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	The Journal of Biological Chemistry. Vol. 272 No. 1 (1997) Kouji Kuno et al. 「Molecular Cloning of Gene Encoding a New Type of Metalloproteinase-disintegrin Family Protein with Thrombospondin Motifs as an Inflammation Associated Gene」 p. 556-562	1~20, 24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.09.98

国際調査報告の発送日

16.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4 B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 21-23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

白血球を低下させることが必要な対象に投与することを含む、白血球の低下方法、血小板の低下に有効な量で、血小板を低下させることが必要な対象に投与することを含む、血小板の低下方法、赤血球の増加に有効な量で、赤血球を増加させることが必要な対象に投与することを含む、赤血球の増加方法に関するものであり、実質的に人または動物の治療による処置方法である。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

1 / 17

FIG. 1

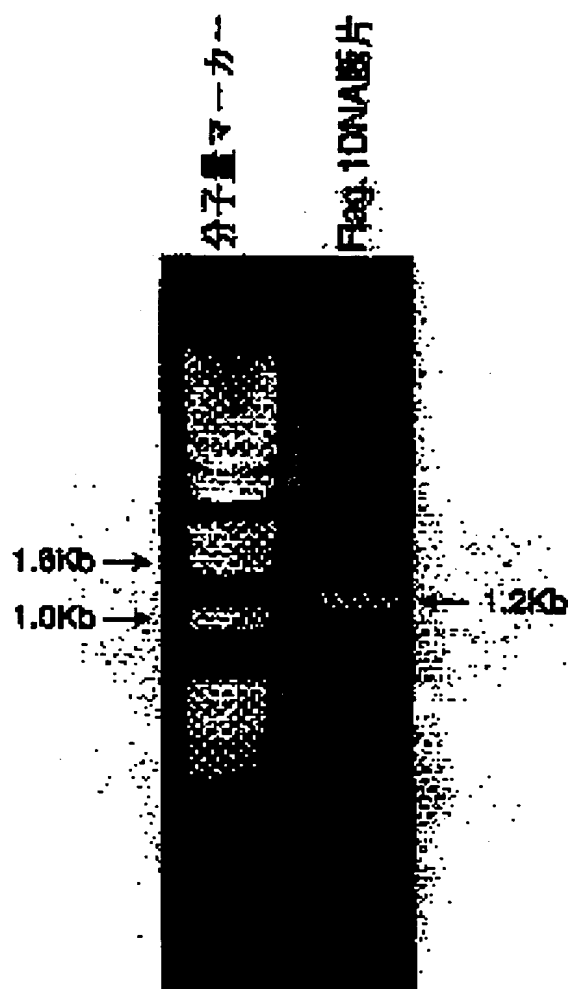
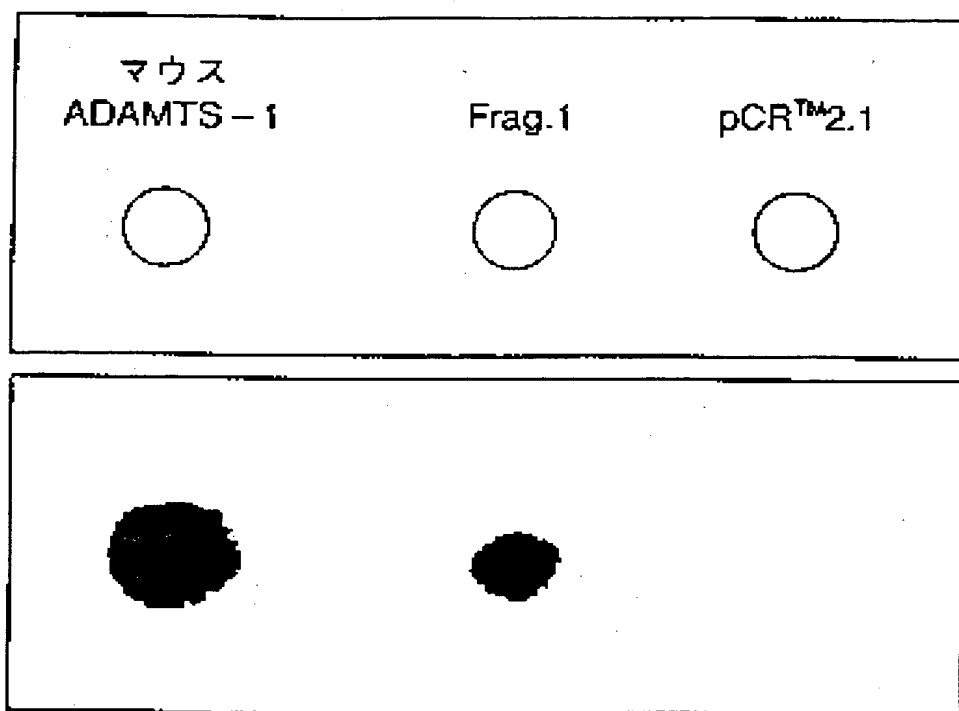


FIG. 2

BNSDOCID: <WO\_\_9855643A1TI\_>

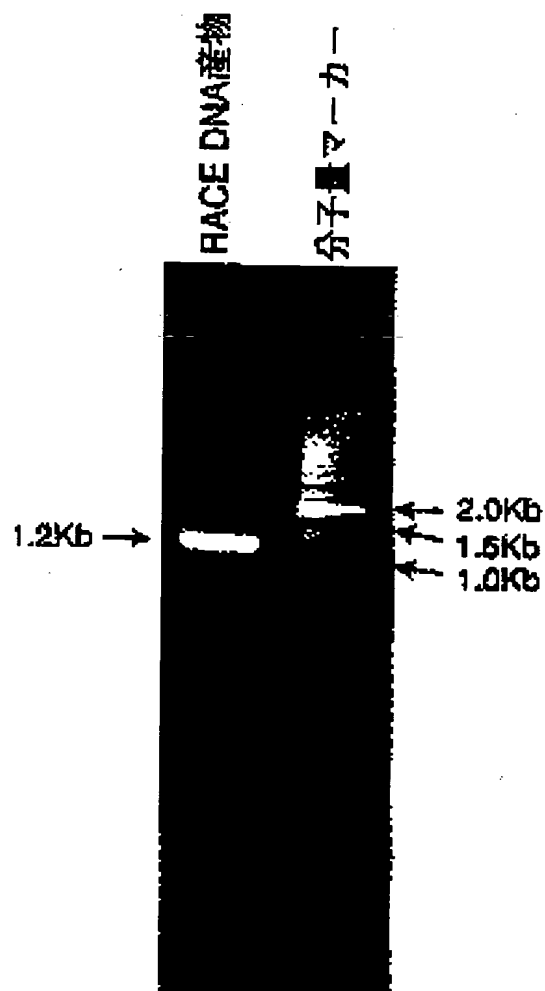
3 / 17

FIG. 3



4 / 17

F I G . 4





5 / 17

## FIG. 5

4u ADAMTS-1 1' ATGGATATCTGCAGAAATTCGGCTTAGGAAGAAGCGATTTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
\* \* \* \* \*  
4v ADAMTS-1 1" AAGCCATCAGGACCCAGGAGCATAGGAAGAAGCGATTTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
\* \* \* \* \*  
6' GAAACCATGCTTGTGGCAGACCGAGTCGATGGCAGAAATTCACGGGCAGTGCTCAAAGCAT  
\* \* \* \* \*  
8" GAAACCATGCTGTAAGCTGACCGAGTCATGGCCGACATTCACGGCAGCGGCTCAAAGCAT  
\* \* \* \* \*  
121' TACCTTCTCACCGTGTGTTTCGGTGGCAGCCAGATTGTACAAACACCCCACTTCTGTAAT  
\* \* \* \* \*  
121" TACCTTCTAACCCGCTGTCTCGGTGGCAGCCAGGTTTACAAAGCATCCCAAGCATTAAGGAAT  
\* \* \* \* \*  
121' TCAGTTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCATCCACGATGAACAGAAAGGGGCCGGAA  
\* \* \* \* \*  
181" TCAAATTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCATACGAGGAGCAGAAAGGACCCAGAA  
\* \* \* \* \*  
241' GTGACCTCCAAATGCTGCCCTCACCTCTGCGGAACCTTTTGCAACTGGCAGAAAGCAGCAAC  
\* \* \* \* \*  
241" GTTACCTCCAAATGCAGGCTCTCACCTTCGGAATTTCTGCAGCTGGCAGAAACACACAAAC  
\* \* \* \* \*  
301' CCACCCAGTGAACCGGGATGCAGAGCACTATGACACAGCAATTCCTTTTCAACCAACAGGAC  
\* \* \* \* \*  
301" AGCCCCAGTGAACCGGGATCCAGAGCACTATGACACCTGCAATTCCTGTTCAACCAACAGGAT  
\* \* \* \* \*  
361' TTGTGTGGGTCCTCAGACATGTGTATACCTTGGGATGGCTGATGTTGGAACTGTGTGTGAT  
\* \* \* \* \*  
361" TTATGTGGCTCCACACAGTGTGTGACACCTGGGAATGGCAGATGTTGGAACTGTGTGTGAC  
\* \* \* \* \*  
421' CCGAGCCAGAAAGCTGCTCCGTCTATAGAAAGATGATGGYTTACAAGCTGCCCTTCAACCAACAGCC  
\* \* \* \* \*  
421" CCCAGCCAGGAGCTGCTCAGTCAIAGAAAGATGATGGYTTGCAAGCTGCCCTTCAACCAACAGCC  
\* \* \* \* \*

6/17

FIG. 6

HU ADAMTS-1 481' CA TGAAT TAGGCCACGCTGTTTAAACAATGCCACACATGATGAIGCAAAGCAGTGTGCCAGCCCT  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 481' CA TGAAT TGGGCCATGTGTTTAAACAATGCCGCACGATGATGCTAAGCACTGTGCCAGCTTG  
\*\*\*\*\*  
501' AATGCTGTGAACCAAGGATTCGCCACATGATGGCGTCAATGCTTTCCAAACCTGGACCAACAGC  
\*\*\*\*\*  
501' AATGCTGTGAGTGGCGATTCTCATCTGATGGCGCTGATGCTCTCCAGCTTAGACCAATAGC  
\*\*\*\*\*  
501' CAGCCCTTGGTCTCTCTTGCAGTGCCCTACATGATTAATCATCATCTCTGGATAAATGGTCAATGG  
\*\*\*\*\*  
501' CAGCCCTGGTCACTCTTGCAGTGCCCTACATGATGATGCTCTCTAGATAAATGGACACGGG  
\*\*\*\*\*  
501' GAATGTTTGTGATGGACAAGCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCCAAGGCGATCTCCCTGGCACCC  
\*\*\*\*\*  
501' GAATGTTTGTGATGGACAAGCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCCTCTCTGATCTTCCCGTACC  
\*\*\*\*\*  
721' TTGTACGATGCCAACCCGGCAGTGGCCAGTTTACATTTGGGGAGGACATCCAAACACTGGCCCC  
\*\*\*\*\*  
721' TTGTACGATGCCAACCCGGCAGTGGCCAGTTTACATTTGGGGAGGAGAAATCCAAAGCACTGGCCCT  
\*\*\*\*\*  
721' GATGCAGCCAGCACATGTAGCACCTTGTGGTGTACCGGCACCTCTGTGGTGGGGTGGCTGGTG  
\*\*\*\*\*  
721' GATGCAGCCAGCACATGTACTACCTGTGGTGTACCTGGCACCTCTGGGTGGCTTACTGGTG  
\*\*\*\*\*  
501' TGTCAAAACCAACACTTCCCGTGGGCGGATGGCACCAAGCTGTGGAGAAAGGAAATGGTGT  
\*\*\*\*\*  
501' TGTCAAAACCAAAACACTTCCCGTGGGCGGATGGCACCAAGCTGTGGAGAAAGGAAATGGTGT  
\*\*\*\*\*  
501' ATCAACGGCAAGTGTGTGAACAAACCGACAGGAAGCATTTGTATACGCTTTTCAATGGA  
\*\*\*\*\*  
501' GTCAAGTGGCAAGTGGTGAACAAACCGACAGGAAGCATTTGTATACGCTTTTCAATGGA  
\*\*\*\*\*

7/17

FIG. 7

H<sub>v</sub> ADAMTS-1 951' AGCTGGGGACCAATGGGGACCGTGGGAGACTGTTCCGAGAAACGTCGGGTGGAGGAGTCCAG  
 \*\*\*\*\*  
 M<sub>u</sub> ADAMTS-1 951" AGCTGGGGACCAATGGGGACCGTGGGAGACTGCTCAAGAACTGTGGTGGTGGAGTTCAA  
 \*\*\*\*\*  
 1021' TACACGATGAGGGAATGTGACAAACCCAGTCCCAAGAAATGGAGGGAAGTACTGTGAAAGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1021" TACACAAATGAGAGATGTGACAAACCCAGTCCCAAGAAACBAGGGGAAGTACTGTGAAGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1081' AAACGAGTGCBCCTACAGATCCTGTAAACCTTGAAGGACTGTCCAGACATATAATGGAAAAACC  
 \*\*\*\*\*  
 1081" AAACGAGTCCBCCTACAGGTCTGTAAACATCGAGGACTGTCCAGACATAAATACGGAAAAACG  
 \*\*\*\*\*  
 1141' TTATGAGAGGAACAATGTGAAGCACACAAAGGAGTTTCAAAAGCTTCCTTTGGGAGTGGG  
 \*\*\*\*\*  
 1141" TTCAGAGAGGAGCAGTGCBAAGGCGCAACAATGAGTTTCCAAAGCTTCCTTTGGGAATGAG  
 \*\*\*\*\*  
 1201' CCTGCGGTGGAAATGGATTCCCAAGTACGCTGGCGTCTCACCAAAAGACAGGTGCAAGCTC  
 \*\*\*\*\*  
 1201" CCCACTGTAGAGTGGACACCCCAAGTACGCCGCGTCTCGCCAAAGACAGGTGCAAGCTC  
 \*\*\*\*\*  
 1261' ATCTGCCAAGCCAAAGGCATTTGGCTACTTCCTCGTTTTCGABCCCAAGGTTGTGATGGT  
 \*\*\*\*\*  
 1261" ACCTGTGAAGCCAAAGGCATTTGGCTACTTTTCTGCTTACAGCCCAAGGTTGTGATGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1321' ACTCCATGTAGCCGAGATTCCACCTCTGCTGTGTGTCAGGACAGTGTGTAAAGCTGGT  
 \*\*\*\*\*  
 1321" ACTCCCTGTAGTCCAGACTCTACCTCTGCTGTGTGTGTCAGGACAGTGTGTGAAAGCTGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1381' TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAATGTGGTGTTCGCGGGGGAAT  
 \*\*\*\*\*  
 1381" TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAAGTGTGGCGTGTGTGAGGGAAC  
 \*\*\*\*\*

8 / 17

## FIG. 8

HU ADAMTS-1 141' GGATCTACTTGTAAAAAATATCAGGATCAGTTACTAGTGC AAAAACCCTGGATATCATGAT  
\*\*  
HU ADAMTS-1 141' GGTTCACATGC AAGAGATGT CAGGAATAGTCACTAGTACAAGACCTGGGTATCATGAC  
\*\* \*\* \*\* \*\*  
150' ATCGTCACAAATTC CAACTGGAGGCCACCAACATCGAAGTGAAACAGCGGAAACCAAGGCGGA  
\*\* \*\* \*\* \*\*  
150' ATGTGCACAAATTC CTGCTGGAGGCCACCAACATTTGAAGTGAAACATCGGAATCAAAAGGCGG  
\*\* \*\* \*\*  
156' TCCAGGAAACAATG GCGAGCTTTCTTGGCATCAAAAGCTGCTGATGGCACATATATTCITAA  
\*\* \*\* \*\*  
158' TCCAGAAACAATG GCGAGCTTTCTGGCTATTAGAGCCGCTGATGGTACCTATATTCITGAA  
\*\* \*\* \*\*  
162' GGTGACTACACTT TGTCCACCTTAGAGCAAGACATATGTACAAAGGTGTGTCTTGAGG  
\*\* \*\* \*\*  
162' GGAAACTTCACTCT GTCCACACTAGAGCAAGACCTCACCACAAAGGTACTGTCTTAAGG  
\*\* \*\* \*\*  
168' TACAGCGGCTCC TCTGCGGCATTGGAAAGAAATTCGCAGCTTTAGCCCTCTCAAAAGAGCC  
\*\* \*\* \*\*  
168' TACAGTGGTTCC TCGGCTGCGCTGGAAAGAAATCCGCAGCTTTAGTCCACTCAAAAGAACCC  
\*\* \*\* \*\*  
174' TEGACCAATCC AGGTTCTTACTGTGGGCAATGCCCCTTCGACCTAAATTAATAACACCTAC  
\*\* \*\* \*\*  
174' TTAAACCATCC AGGTTCTTATGTTAGGCCATGCTCTCCGACCCCAAAATTAATAATCACCTAC  
\*\* \*\* \*\*  
180' TTCTGTAAAGAA GAGGAATCTTTTCAATGCTATCCCCACITTTTTCAGCATGGGTCAAT  
\*\* \*\* \*\*  
180' TTATGAAGAAAG AAGACAGAGTCATTCACGCCATTCCACATTTTCTGAGTGGGTGAT  
\*\* \*\* \*\*  
186' GAAGAGTGGGGCG AATGTTCTAAAGTCAATGTGAATGGGTGGCAGAGAAAGACTGGTAGAA  
\*\* \*\* \*\*  
186' GAAGAGTGGGGCG GAGTGTCTCCAAGACATCGGGCTCAGGTTGGCAGAGAAAGTAGTGCAG  
\*\* \*\* \*\*

9/17

F I G. 9

Hu ADAMTS-1 1921' TCCCGAGACATTAATGGACAGCCCTGCTTCGGAGTGTGCAAGGAAAGTGAAGCCAGCCAGC  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-1 1921' TCGAGAGACATTAAAGGACACCCCTGCTTCGGAATGTGCAAGGAAAGTGAAGCCAGCCAGT  
 1981' ACCAGAGCCCTTGTGCAGACCATCCCTGCCCCAGTGGCAGCTGGGGGAGTGGTCATCATGT  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 1991' ACCAGAGCCCTTGTGCAGACCTTCCTTGCCACACTGGCAGGTGGGGGATGGTCAACCATGT  
 2041' TCTAAGACCTGTGGGAAGGGTTACAAAAAGAAAGCTTGAAGTGTCTGTCCCATGATGGA  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 2041' TCCAAACCTTCCGGGAAGGCTTACAAGAGAGAACCTTGAAATGTGTGCCCCACGATGGG  
 2101' GGGGTGTTATCTCATGAGAGCTGTGATCCTTAAAGAAACCTAAACATTTCAATAGACTTT  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 2101' GGCCTGTATTATCAATGAGAGCTGTGATCCTTGAAGAGCCCAAGCAATTACATTGACTTT  
 2161' TGCACACTGACACACAGTGCCAGTTAA  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 2161' TGCACACTGACACACAGTGCCAGTTAA

FIG. 10

→MMP: 2.45

11/17

## FIG. 11

Hu ADAMTS-1 241' LYDANRQCQFTFGEDSKHCPDAASTCSTLW  
 \*\*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-1 241" LYDANRQCQFTFGEE SKHCPDAASTCTTLW

271' CTGTSGGV LVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC  
 \*\*\*\*\*  
 271" CTGTSGGL LVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC

301' INGKCVNKTD RKHFOTPFHGS TSPFXIN WGPWGPWGO  
 \*\*\*\*\*  
 301" VSGKCVNKTD MKHFATPVHGS WGPWGPWGO

331' CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG  
 \*\*\*\*\*  
 331" CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG

361' KRVRYRSCNLED CPDNNGKTFREEQCEAHN  
 \*\*\*\*\*  
 361" KRVRYRSCNIEG CPDNNGKTFREEQCEAHN

391' EFSKASFGSGPAVEWIPKYAGVSPKDRCKL  
 \*\*\*\*\*  
 391" EFSKASFGNEPTVEWTPKYAGVSPKDRCKL

421' ICQAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV  
 \* \*\*\*\*\*  
 421" TCEAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV

451' CVQGQC VKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN  
 \*\*\*\*\*  
 451" CVQGQC VKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN

481' GSTCKKISGSVTS AKPGYHDIVTIPYGATN  
 \*\*\*\*\*  
 481" GSTCKKMSGIVTSTRPGYHDIVTIPAGATN

12/17

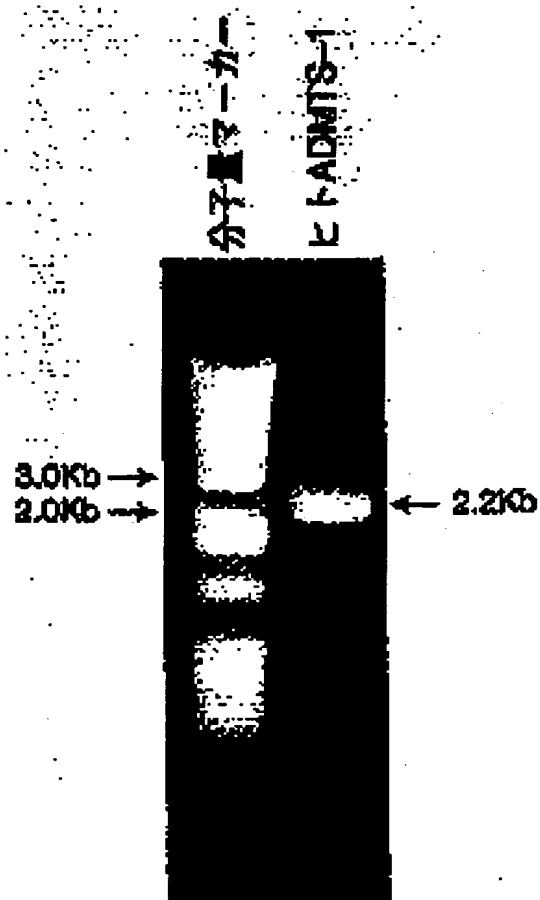
## FIG. 12

Hu ADAMTS-1 531' IEVKQRNQRGSRNNGSFLAIXAADGTYILN  
 \*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-2 511' IEVKHRNQRGSRNNGSFLAIRAADGTYILN  
  
 541' DDYTLSTLEQDIMYKGVVLRYSGSSAALER  
 \*  
 541" GNFTLSTLEQDLTYKOTVLRYSGSSAALER  
  
 571' IRSFSPLKEPLTIQVLTVGNALRPKIKYTY  
 \*\*\*\*\*  
 571" IRSFSPLKEPLTIQVLMVGHALRPKIKFTY  
  
 TSPFXIN  
 601' FVKKKKESFNAIPTFSWVIEEWGECSSKSC  
 \*  
 601" FMKKKTESFNAIPTFSWVIEEWGECSSKTC  
  
 631' ELGWQRRRLVECRDINGQPASECAKEVKPAS  
 \*\*\*\*\*  
 631" GSDWQRRRVVQCRDINGHPASECAKEVKPAS  
  
 TSPFXIN  
 661' TRPCADHPCPQWQLGEWSSCSKTCGKGYKK  
 \*\*\*\*\*  
 661" TRPCADLPCHWQVGDWSPCSKTCGKGYKK  
  
 691' RSLKCLSHDGGVLSHESCDPLKKPKHFIDF  
 \*  
 691" RTLKCVSHDGGVLSNESCDPLKKPKHYIDF  
  
 721' CTLTQCS  
 \*\*\*  
 721" CTLTQCS



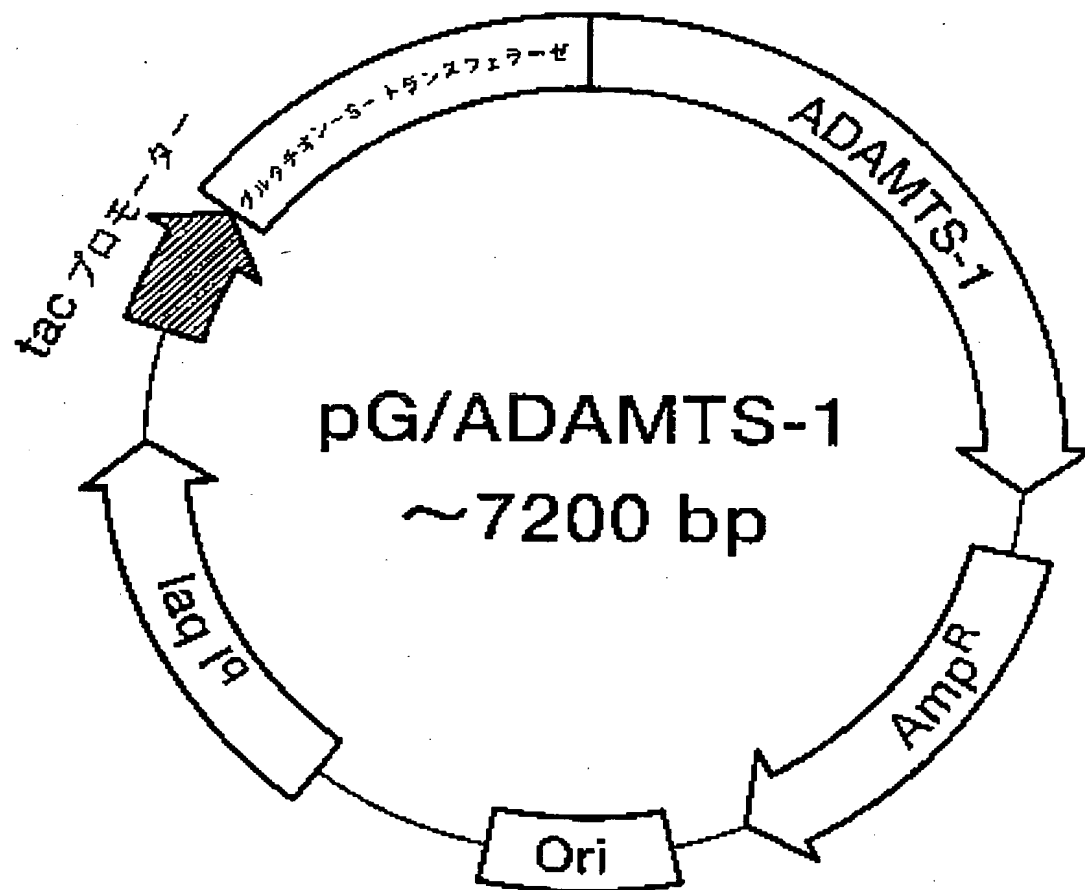
13/17

FIG. 13



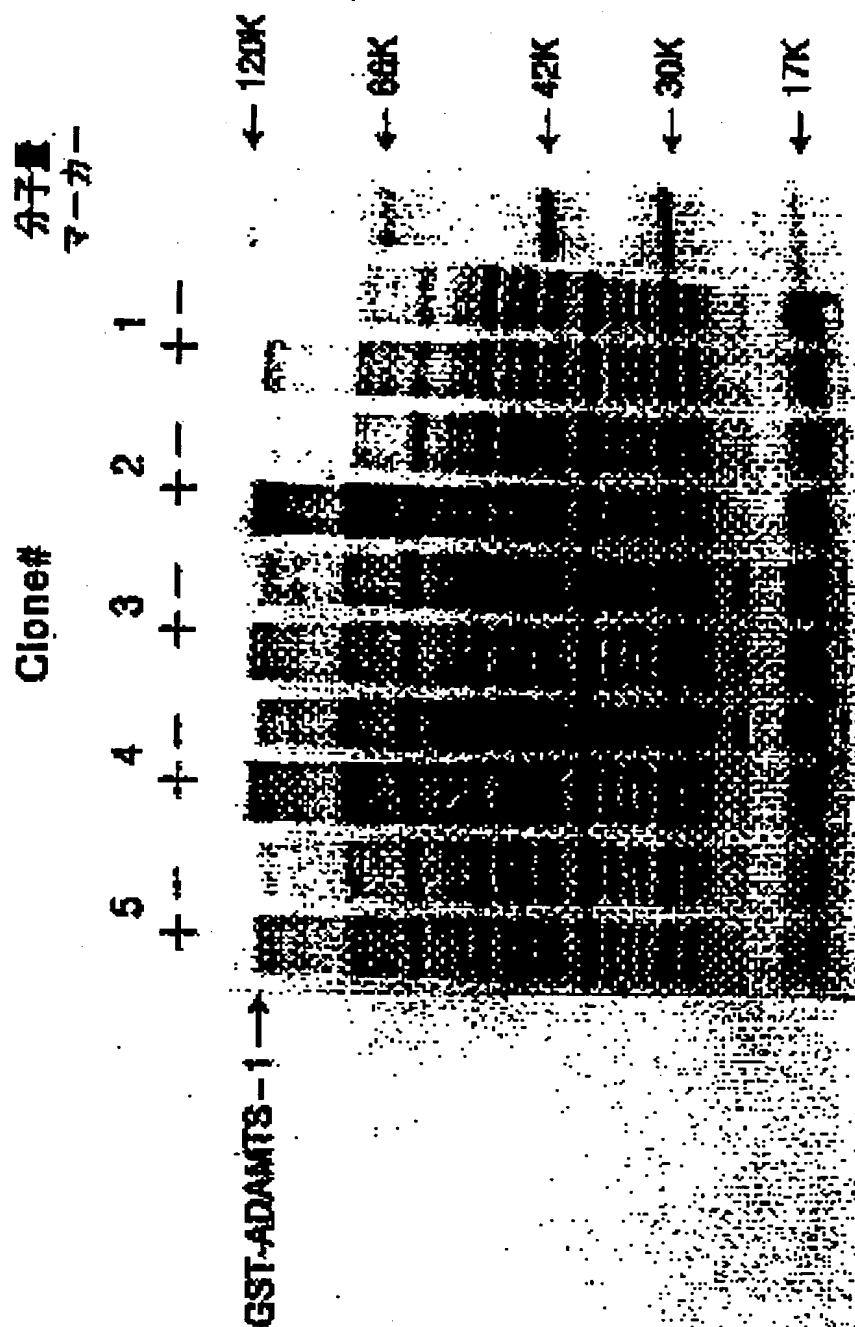
14/17

FIG. 14



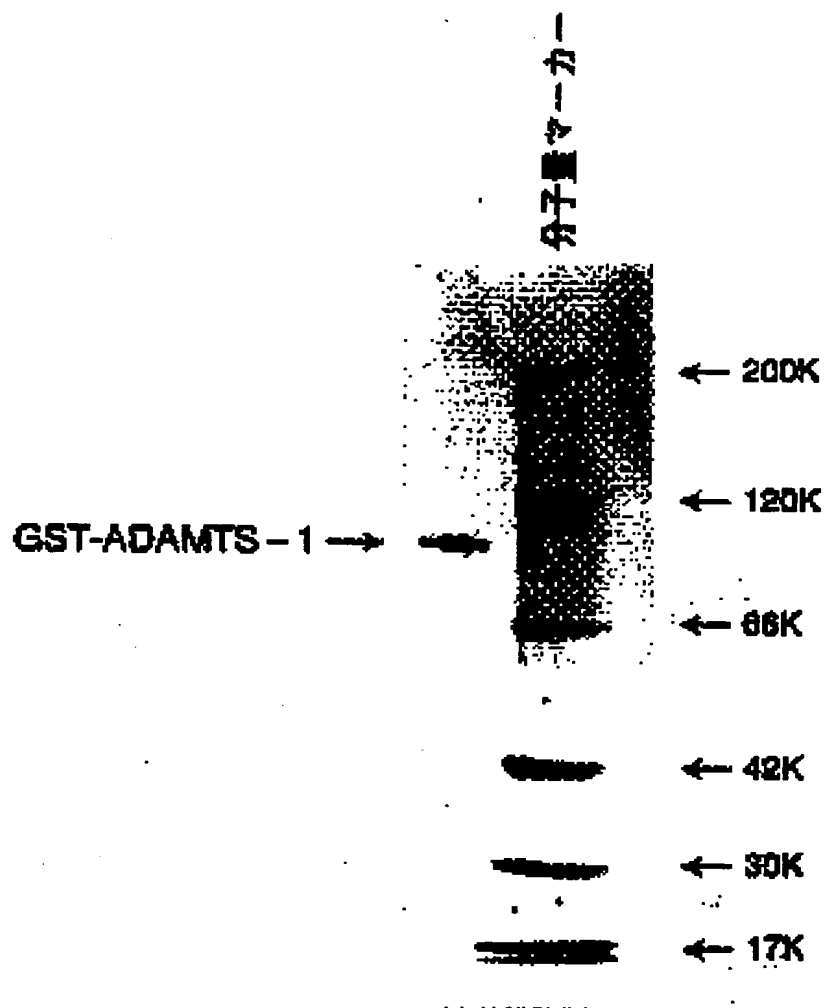
15 / 17

FIG. 15



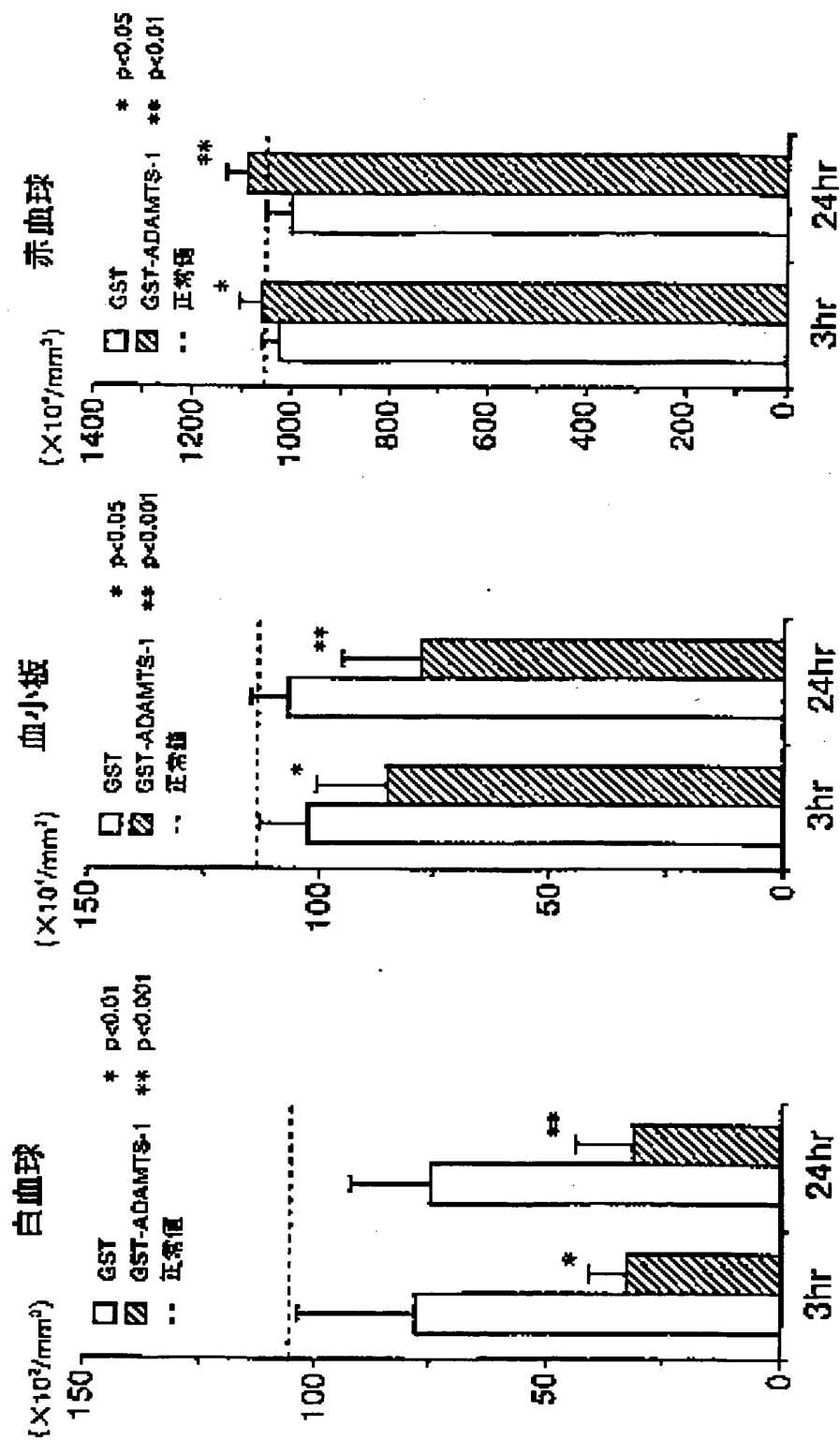
1.6 / 17

FIG. 16



17/17

FIG. 17



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 004 674 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

31.05.2000 Bulletin 2000/22

(21) Application number: 98923100.6

(22) Date of filing: 03.06.1998

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12P 21/02**, C12N 15/12,

C12N 1/21, A61K 38/43,

A61K 38/48, A61K 38/16,

G01N 33/53, A23L 1/305

// (C07K14/745, 14:78, 16:18,

19:00), C12P21:02, C12R1:19

(86) International application number:

PCT/JP98/02449

(87) International publication number:

WO 98/55643 (10.12.1998 Gazette 1998/49)

(84) Designated Contracting States:

DE FR GB

(30) Priority: 03.06.1997 JP 16042297

(71) Applicant:

Kureha Chemical Industry Co., Ltd.

Tokyo 103-8552 (JP)

(72) Inventors:

• HIROSE, Kunitaka

Tokyo 179-0074 (JP)

• INOUCHI, Eiji

Tatebayashi-shi, Gunma 374-0057 (JP)

• HAKOZAKI, Michinori

Kawaguchi-shi Saitama 333-0847 (JP)

• ISHIOKA, Keiko

Kodaira-shi, Tokyo 187-0011 (JP)

• ISHIDA, Yukako

Komae-shi Tokyo 201-0001 (JP)

• MATSUSHIMA, Kouji

Matsudo-shi Chiba 271-0092 (JP)

• KUNO, Koji

Kanazawa-shi, Ishikawa 920-0965 (JP)

(74) Representative:

Cohausz & Florack

Patentanwälte

Kanzlerstrasse 8a

40472 Düsseldorf (DE)

(54) **HUMAN ADAMTS-1 PROTEIN, GENE CODING FOR THE SAME, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND METHOD FOR IMMUNOLOGICALLY ASSAYING HUMAN ADAMTS-1 PROTEIN**

(57) A human ADAMTS- protein, a gene coding for the same, a pharmaceutical composition containing the protein as the active ingredient, and a method for immunologically assaying a human ADAMTS-1 protein. The protein can lower the number of leukocytes and thrombocytes and at the same time can increase the number of erythrocytes.

**EP 1 004 674 A1**

## Description

## TECHNICAL FIELD

- 5 [0001] The present invention relates to a human ADAMTS-1 protein, a gene encoding the same, a pharmaceutical composition, and a method for immunologically analyzing the human ADAMTS-1 protein.

## BACKGROUND ART

- 10 [0002] A mouse ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)-1 gene has been cloned as a cDNA from a mouse colon cancer cell which induces cancer cachexia when transplanted to a mouse. The mouse ADAMTS-1 protein encoded by the gene is a unique protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and three thrombospondin domains [J. Biol. Chem., 272, 556-562 (1997)]. The physiological functions of the mouse ADAMTS-1 protein has not been reported, but there have been reports of each individual functional domain contained therein.

15 [0003] For example, a snake venom disintegrin belongs to a family of proteins which are rich in cysteine, and exhibit an anticoagulant activity [Semin. Hematol., 31, 289-300 (1994)].

- [0004] Further, for example, an ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) family is known as a protein family containing a matrix metalloproteinase domain and a disintegrin domain [Nature, 377, 652-656 (1995); Nature Genet., 5, 151-157 (1993); Nature, 356, 248-252 (1992)]. Examples of known ADAM family proteins are fertilin, epidermal apical protein, cyritestin, MDC (metalloprotease-like, disintegrin-like and cystein-rich protein), meltrin, MS2, and metargidin [Nature, 377, 652-656 (1995); Nature Genet. 5, 151-157 (1993); Nature, 356, 248-252 (1992); Biochem. J., 286, 671-675 (1992); Dev. Growth. Differ., 36, 49-58 (1994); Int. Immunol., 2, 585-591 (1990); J. Biol. Chem., 271, 4593-4596 (1996)].

- 25 [0005] It was reported that fertilin is involved in an integrin-mediated sperm-egg binding [Nature, 356, 248-252 (1992)], and meltrin is involved in a myotube formation [Nature, 377, 652-656 (1995)]. MDC expressed mainly in a central nervous system is a candidate as a suppresser against a human breast cancer [Nature Genet. 5, 151-157 (1993)], and MS2 serves as a macrophage antigen [Int. Immunol., 2, 585-591 (1990)]. However, little have been known about the physiological roles of these ADAM family proteins.

- 30 [0006] The mouse ADAMTS-1 protein contains a matrix metalloproteinase domain and a disintegrin domain, and therefore belongs to the ADAM family. However, the mouse ADAMTS-1 protein is different from other known ADAM family proteins in that it further contains thrombospondin domains.

- [0007] As mentioned, the ADAM family proteins have various kinds of activities such as the involvement of bone or muscle metabolism, suppression of cancer growth, or fertilization, and the thrombospondin exhibits an action to inhibit vascularization and suppresses cancer. Therefore, it is expected that the mouse ADAMTS-1 protein will exhibit unique physiological functions.

- [0008] The inventors of the present invention attempted to isolate the corresponding human ADAMTS-1 protein. Accordingly, the present inventors designed and prepared various probes on the basis of the base sequence of the known mouse ADAMTS-1 gene, and carried out plaque hybridizations with a human kidney cDNA library so as to obtain a human ADAMTS-1 gene, but a desired gene was not obtained. Then, the present inventors designed and prepared various primers on the basis of the base sequence of the known mouse ADAMTS-1 gene, and carried out PCRs, using the human kidney cDNA library as templates under ordinary conditions, so as to obtain the desired gene, but did not succeed.

- 45 [0009] Thereafter, the present inventors carried out a PCR of the human kidney cDNA library, using the same primers, but under conditions milder than those ordinarily used, more particularly, an annealing temperature is set lower than an ordinary temperature, and the inventors successfully obtained a novel human ADAMTS-1 gene. The resulting gene was then, expressed in E. coli, and the biological activities of the recombinant human ADAMTS-1 protein were examined. Surprisingly, it was found that the novel human ADAMTS-1 protein can decrease the numbers of leukocytes and platelets, and at the same time, increase the number of erythrocytes. Such activities in influencing hematopoietic functions cannot be expected from the structure of the mouse ADAMTS-1 gene which was used as the basis in designing the primers, or from the functions of domains contained in the human ADAMTS-1 protein. The present invention is based on the above findings.

## DISCLOSURE OF INVENTION

- 55 [0010] The present invention relates to a protein characterized by containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1:



EP 1 004 674 A1

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser  
5 Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu  
Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val  
10 Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu  
Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu  
Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln  
15 Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr  
Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp  
20 Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser  
Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala

His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
5 Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
10 Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
15 Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
20 Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
25 Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
30 Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp  
35 Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
40 Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro  
45 Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu  
Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu  
Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
50 Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
55

Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
 Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser  
 Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly  
 Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
 Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
 Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
 Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
 Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
 His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
 Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser.

**[0011]** Further, the present invention relates to the variation of proteins which are equivalent to the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

**[0012]** Further, the present invention relates to a protein characterized by containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain, except for a mouse ADAMTS-1 protein.

**[0013]** Further, the present invention relates to a gene characterized by encoding the above novel proteins.

**[0014]** Further, the present invention relates to a vector characterized by containing the above gene.

**[0015]** Further, the present invention relates to a transformant characterized by being transformed by the above vector.

**[0016]** Further, the present invention relates to a pharmaceutical composition characterized by comprising (1) the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, (2) the variation functionally equivalent to the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or (3) the protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain.

**[0017]** Further, the present invention relates to an immunologically reactive substance (such as a polyclonal antibody or a monoclonal antibody, or an antibody fragment thereof, or an antiserum) characterized by nature of being capable of specifically reacting with the novel proteins.

**[0018]** Further, the present invention relates to a method for immunologically analyzing the human ADAMTS-1 protein, characterized in that a sample is brought into contact with the immunologically reactive substance, and a complex of the human ADAMTS-1 protein and the immunologically reactive substance is detected.

**[0019]** Further, the present invention relates to a method for analyzing an mRNA of the human ADAMTS-1 protein, characterized in that a sample is brought into contact with a polynucleotide containing a base sequence complementary to that of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, and a complex of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein and the gene is detected.

**[0020]** Further, the present invention relates to a method for extracorporeally detecting an immunological state, characterized by analyzing the human ADAMTS-1 protein or the mRNA thereof.

**[0021]** Further, the present invention relates to an agent for analyzing an immunological state, characterized by containing the immunologically reactive substance capable of immunologically reacting the human ADAMTS-1 protein or the polynucleotide containing the base sequence complementary to that of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein.

## BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

[0022]

- 5 Figure 1 shows the results of an electrophoresis of a Flag. 1 DNA fragment produced by a PCR.  
 Figure 2 shows a homology between the mouse ADAMTS-1 gene and the Flag. 1 DNA fragment.  
 Figure 3 shows results of dot hybridization of the Flag. 1 DNA fragment.  
 Figure 4 shows results of an electrophoresis of a Flag. 2 DNA fragment produced by a RACE.  
 Figure 5 shows a homology in base sequences of the bases 1 to 480 in the human ADAMTS-1 gene and the mouse  
 10 ADAMTS-1 gene.  
 Figure 6 shows a homology in base sequences of the bases 481 to 960 in the human ADAMTS-1 gene and the  
 mouse ADAMTS-1 gene.  
 Figure 7 shows a homology in base sequences of the bases 961 to 1440 between the human ADAMTS-1 gene and  
 the mouse ADAMTS-1 gene.  
 15 Figure 8 shows a homology in base sequences of the bases 1441 to 1920 between the human ADAMTS-1 gene  
 and the mouse ADAMTS-1 gene.  
 Figure 9 shows a homology in base sequences of the bases 1921 to 2184 between the human ADAMTS-1 gene  
 and the mouse ADAMTS-1 gene.  
 Figure 10 shows a homology in amino acid sequences of the amino acids 1 to 240 between the human ADAMTS-  
 20 1 protein and the mouse ADAMTS-1 protein.  
 Figure 11 shows a homology in amino acid sequences of the amino acids 241 to 510 between the human  
 ADAMTS-1 protein and the mouse ADAMTS-1 protein.  
 Figure 12 shows a homology in amino acid sequences of the amino acids 511 between 727 in the human  
 ADAMTS-1 protein and the mouse ADAMTS-1 protein.  
 25 Figure 13 shows results of an electrophoresis of a full-length cDNA of the human ADAMTS-1 gene of the present  
 invention, the cDNA being produced by a PCR.  
 Figure 14 schematically illustrates a structure of plasmid pG/ADAMTS-1 of the present invention.  
 Figure 15 shows results of an electrophoresis of a transformant transformed by the plasmid pG/ADAMTS-1.  
 Figure 16 shows results of an electrophoresis of a GST-human ADAMTS-1 fusion protein.  
 30 Figure 17 provides graphs showing effects on the numbers of blood cells when the GST-human ADAMTS-1 fusion  
 protein is intravenously administered to a mouse in a single dosage.

## BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

- 35 [0023] The present invention will be explained in detail hereinafter.  
 [0024] The human ADAMTS-1 protein of the present invention is a novel protein consisting of 727 amino acid res-  
 idues; that is, consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. As shown in Figs. 10 to 12, the human ADAMTS-  
 1 protein of the present invention contains a matrix metalloproteinase (hereinafter sometimes referred to as "MMP")  
 domain consisting of the 12th to 230th amino acid residues counting from the N-terminal amino acid residue, methio-  
 40 nine; a disintegrin (hereinafter sometimes referred to as "DI") domain consisting of the 235th to 305th amino acid resi-  
 dues; and three thrombospondin (hereinafter sometimes referred to as "TSP") domains consisting of the 322nd to  
 372nd, 618th to 664th, and 672nd to 727th amino acid residues. The human ADAMTS-1 protein contains many  
 arginines and lysines, which are basic amino acids, in a C-terminal region. Therefore, it is believed that the human  
 ADAMTS-1 protein interacts with sulfated polysaccharide molecules, such as heparin or heparan sulfate, in blood.  
 45 [0025] The novel protein according to the present invention includes the protein containing the amino acid  
 sequence of SEQ ID NO: 1; and a variation functionally equivalent to the protein containing the amino acid sequence  
 of SEQ ID NO: 1 (hereinafter sometimes referred to as a "human ADAMTS-1 protein variation"). The term "human  
 ADAMTS-1 protein variation" as used herein means a protein having an amino acid sequence wherein one or more  
 (particularly one or several) amino acids are deleted in, changed in, or inserted to the amino acid sequence of the  
 50 human ADAMTS-1 protein, that is, the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, and exhibiting activities of the human  
 ADAMTS-1 protein. A preferable human ADAMTS-1 protein variation has a 92% or more homology in the amino acid  
 sequence with the human ADAMTS-1 protein. The human ADAMTS-1 protein variation includes a fragment which is a  
 part of the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and exhibits the activities of the human  
 ADAMTS-1 protein; and a fragment which is a part of another human ADAMTS-1 protein variation and exhibits the  
 55 activities of the human ADAMTS-1 protein.  
 [0026] The term "human ADAMTS-1 activity" as used herein means an activity to decrease the numbers of leuko-  
 cytes and platelets, and at the same time, increase the number of erythrocytes.  
 [0027] Further, the novel protein of the present invention includes a protein containing a matrix metalloproteinase

domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain (hereinafter sometimes referred to as an "ADAMTS protein"). However, the mouse ADAMTS-1 protein is not included in the novel protein of the present invention.

[0028] The term "matrix metalloproteinase domain" as used herein means a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more (preferably 95% or more) homology with the amino acid sequence of the matrix metalloproteinase domain in the human ADAMTS-1 protein, i.e., the amino acid sequence of the 12th to 230th amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

[0029] The term "disintegrin domain" as used herein means a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more (preferably 93% or more) homology with the amino acid sequence of the disintegrin domain in the human ADAMTS-1 protein, i.e., the amino acid sequence of the 235th to 305th amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

[0030] The term "thrombospondin domain" as used herein means a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more homology with at least one of the amino acid sequences of three disintegrin domains in the human ADAMTS-1 protein, that is,

(1) a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more (preferably 99% or more) homology with the amino acid sequence of the first thrombospondin domain (hereinafter sometimes referred to as a "human TSP-1 domain") from the N-terminus in the human ADAMTS-1 protein, i.e., the amino acid sequence of the 322nd to 372nd amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1;

(2) a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more (preferably 88% or more) homology with the amino acid sequence of the second thrombospondin domain (hereinafter sometimes referred to as a "human TSP-2 domain") from the N-terminus in the human ADAMTS-1 protein, i.e., the amino acid sequence of the 618th to 664th amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; or

(3) a domain containing an amino acid sequence having a 50% or more (preferably 88% or more) homology with the amino acid sequence of the third thrombospondin domain (hereinafter sometimes referred to as a "human TSP-3 domain") from the N-terminus in the human ADAMTS-1 protein, i.e., the amino acid sequence of the 672nd to 727th amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

[0031] In the ADAMTS protein of the present invention, the number of each of the matrix metalloproteinase domain, the disintegrin domain, and the thrombospondin domain, and the sequential order thereof, are not particularly limited, so long as at least one matrix metalloproteinase domain, at least one disintegrin domain, and at least one thrombospondin domain are contained at the same time in the ADAMTS protein. A preferred ADAMTS protein contains a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain and three thrombospondin domains. Further, the sequential order of the domains from the N-terminus to the C-terminus preferably starts from the matrix metalloproteinase domain, followed by the disintegrin domain, and then the thrombospondin domain. When three thrombospondin domains are contained, the sequential order of the domains from the N-terminus to the C-terminus preferably starts from the matrix metalloproteinase domain, followed by the disintegrin domain, and then the first TSP domain, the second TSP domain and the third TSP domain.

[0032] In the ADAMTS protein of the present invention, it is preferable that

(1) the matrix metalloproteinase domain has a 95% or more homology in the amino acid sequences with the matrix metalloproteinase domain in the human ADAMTS-1 protein,

(2) the disintegrin domain has a 93% or more homology in the amino acid sequences with the disintegrin domain in the human ADAMTS-1 protein, and

(3) at least one of the thrombospondin domains has a 99% or more homology in the amino acid sequence with the TSP-1 domain in the human ADAMTS-1 protein, an 88% or more homology in the amino acid sequences with the TSP-2 domain in the human ADAMTS-1 protein, or an 88% or more homology in the amino acid sequences with the TSP-3 domain in the human ADAMTS-1 protein.

[0033] In the present ADAMTS protein containing three thrombospondin domains, it is preferable that

(3-1) the first thrombospondin domain from the N-terminus has a 99% or more homology in the amino acid sequences with the TSP-1 domain in the human ADAMTS-1 protein,

(3-2) the second thrombospondin domain from the N-terminus has an 88% or more homology in the amino acid sequences with the TSP-2 domain in the human ADAMTS-1 protein, and

(3-3) the third thrombospondin domain from the N-terminus has an 88% or more homology in the amino acid sequences with the TSP-3 domain in the human ADAMTS-1 protein.

[0034] The protein of the present invention may be prepared by various known processes. For example, the protein

of the present invention may be prepared using a known genetic engineering technique and the gene of the present invention. Alternatively, the protein of the present invention may be purified from a naturally occurring source, using a known protein chemical technique.

[0035] The gene of the present invention includes a gene encoding the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein; a gene encoding the human ADAMTS-1 protein variation; and a gene encoding the ADAMTS protein (except the mouse ADAMTS-1 protein). The present gene may be DNA or RNA. The gene encoding the human ADAMTS-1 protein may be, for example, a gene consisting of the base sequence of SEQ ID NO: 2:

```
10  ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC
    CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA
15  TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG
    GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG
20  GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA
    GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG
    AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA
25  GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT
    ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC
30  TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC
    CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG
35  TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA
    ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC
40  TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG
    GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GGC GAT CTC CCT GGC ACC
    TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC
45  AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC
    GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG
```

EP 1 004 674 A1

GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG  
 TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA  
 AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT  
 GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG  
 AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CGA GTG CGC TAC AGA TCC TGT  
 AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA  
 CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG  
 CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC  
 AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT  
 TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC  
 TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC  
 ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT  
 GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT  
 GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA  
 GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT  
 GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT  
 TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG  
 TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT  
 CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT  
 CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT  
 TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC  
 GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA  
 TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG  
 AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG  
 CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC  
 AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT

CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT  
 TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA

[0036] The gene of the present invention, such as the gene consisting of the base sequence of SEQ ID NO: 2, may be obtained, for example, by the following method, which was used by the present inventors when the present gene was obtained for the first time.

[0037] That is, various suitable primers for a PCR are prepared on the basis of the base sequence of the mouse ADAMTS-1 gene. DNA fragments may be obtained by carrying out a PCR under a condition milder than that of an ordinary PCR, i.e., at an annealing temperature lower than a usual annealing temperature, using a human kidney cDNA library as templates. Base sequences of the resulting DNA fragments are determined, and compared with the base sequence of the mouse ADAMTS-1 gene, to thereby identify the resulting DNA fragments as the desired genes. Depending on the primers used in the PCR, a full-length human ADAMTS-1 gene or a partial base sequence of the human ADAMTS-1 gene may be obtained. When the partial base sequence is obtained, the remaining base sequence of the gene may be obtained by a RACE (Rapid amplification of cDNA ends) method [Proc Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)], and partial base sequences may be ligated by genetic-engineering to obtain the full-length base sequence.

[0038] When the present inventors designed the base sequences of the primers used to obtain the gene in the above method for the first time, the base sequence of the human ADAMTS-1 gene was not known. Therefore, it was almost impossible to select base sequences having a complete homology between the mouse ADAMTS-1 gene and the human ADAMTS-1 gene.

[0039] The present inventors used primers designed on the basis of the base sequence of the mouse ADAMTS-1 gene to carry out a PCR at a usual temperature, but a desired DNA fragment could not be obtained. However, the present inventors used the same primers and carried out a PCR under a condition milder than that of an ordinary PCR, i.e., an annealing temperature was set lower than a usual annealing temperature, whereby the desired DNA fragment was able to be obtained. The comparison of the base sequence of the resulting human ADAMTS-1 gene with the base sequences of the primers used revealed an insufficient homology.

[0040] At present, the base sequence of the human ADAMTS-1 gene has been determined according to the present invention. Therefore, the base sequence of the human ADAMTS-1 gene may be used to design primers for a PCR or probes for plaque hybridization. Such primers or probes may be used to obtain the gene of the present invention by a known method to obtain a gene, such as a PCR under ordinary conditions or plaque hybridization, instead of the method used by the present inventors to obtain the present gene for the first time.

[0041] The present inventors attempted to obtain an unknown human ADAMTS-1 gene from the human kidney cDNA library by plaque hybridization, using probes designed on the basis of the base sequence of the known mouse ADAMTS-1 gene, but a desired gene was not obtained. One of the reasons of this failure was an insufficient homology of the probes used. Further, the present inventors have carried out northern hybridization to analyze the mRNA of the human ADAMTS-1 protein, and confirmed that the failure must also have occurred because mRNA is expressed in a very small amount, and thus a very small number of the human ADAMTS-1 genes are copied in a cDNA library.

[0042] The gene of the present invention may be obtained by plaque hybridization, using probes designed on the basis of the base sequence of the human ADAMTS-1 gene.

[0043] The resulting gene of the present invention may be expressed in, for example, a eucaryotic or procaryotic host to produce the protein of the present invention.

[0044] If a DNA fragment containing a desired gene is directly introduced into a host cell, the fragment is not reproduced. However, an extrachromosomal gene reproducible in a cell, such as a plasmid, may be used as a vector to prepare an expression plasmid. A vector which may be used preferably contains genetic information necessary for replication in a host cell, can be independently replicated, is easily isolated and purified from a host cell, and contains a detectable marker.

[0045] An expression vector containing the DNA of the present invention may be constructed in accordance with a host cell from various commercially available vectors. A method for introducing the DNA into the vector is well known.

[0046] As a procaryotic host, there may be mentioned, for example, *E. coli* strains, such as XL1-Blue, HB101, JM109, DH5 $\alpha$ , AG-1, K12 strain 294 (ATCC 31446), B,  $\chi$ 1776 (ATCC 31537), C600, or W3110 (F<sup>-</sup>,  $\lambda$ -, prototrophic; ATCC 27375). Further, *Bacillus* strains, such as *Bacillus subtilis*, enteric bacteria, such as *Salmonella typhimurium* or *Serratia marcescens*, or *Pseudomonas* strains may be used.

[0047] When the procaryotic host is used, an expression plasmid which may be used as a vector contains a pro-



moter, an SD base sequence, and a base sequence necessary for initiating a protein synthesis, i.e., ATG, upstream of the gene of the present invention so as to express the gene. As a vector for *E. coli* strains, pUC19, pBR322, or pBR327 are generally and widely used.

[0048] As a promoter, for example, triptophan promoter,  $P_L$  promoter, lac promoter, tac promoter, trc promoter, lpp promoter, or  $\beta$ -lactamase promoter may be used. Examples of the marker gene are an ampicillin resistance gene or tetracycline resistance gene.

[0049] As a eucaryotic host, a yeast is generally and widely used. Of the yeasts, a *Saccharomyces* yeast can be advantageously used. As an expression vector for the eucaryotic host such as a yeast, for example, YRp7 may be used.

[0050] As a promoter of the expression vector for a yeast expression, for example, alcohol dehydrogenase (ADH), GAL10, 3-phosphoglycerate kinase, enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, or hexokinase may be used. An example of a marker gene is a trp1 gene.

[0051] As a replication origin, a stop codon, or other DNA sequences used to control a transcription or translation in a yeast cell, usual known DNA sequences suitable to the yeast cell may be used.

[0052] As a culture cell host of a higher animal, there may be mentioned, for example, a rhesus renal cell, a mosquito larva cell, an African Green Monkey kidney cell (COS-7 or COS-1), a murine fetal fibroblast, a Chinese hamster ovary cell or a dihydrofolate reductase-defective strain thereof, a human cervical epitheliocyte, a human fetal kidney cell, a moth ovary cell, a human myeloma cell, or a murine fibroblast cell.

[0053] The vector generally contains functional sequences to express the DNA of the present invention in a host cell, for example, a replication origin, a promoter, which should be upstream of the DNA of the present invention, a ribosome binding site, a polyadenylated site, and/or a transcription termination sequence. A preferable promoter is, for example, an adenovirus 2 main late promoter, SV40 early promoter, SV40 late promoter, or a promoter from cytomegalovirus, Rous sarcoma virus, or an eucaryote gene, such as estrogen inducible chick egg albumin gene, interferon gene, glucocorticoid inducible threonine aminotransferase gene, thymidine kinase gene, main early and late adenovirus gene, phosphoglycerate kinase gene, or  $\alpha$  factor gene.

[0054] A replication origin from adenovirus, SV40, bovine papilloma virus (BPV), vesicular stomatitis virus (VSV), or a derivative vector thereof may be used as the replication origin. In these cases, for example, a neomycin resistance gene, a methotrexate resistant dihydrofolate reductase (DHR) gene, or a blasticidin S resistance gene may be used as the marker gene.

[0055] As an insect cell host, for example, BmN4 cell, Sf9 cell, Sf21 cell, or an ovary cell of *Trichoplusia ni* may be used. Further, a larval silkworm individual may be used as a host. A gene transfer to the insect cell can be carried out by co-infecting the insect cell with a virus DNA and a transfer vector containing a desired gene to be incorporated. As the virus DNA, for example, a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, or *Autographica californica* multiple nuclear polyhedrosis virus may be used. As the transfer vector containing the desired gene to be inserted, for example, a polyhedrin promoter or p10 promoter vector may be used. The desired gene can be inserted downstream of the promoters. The transfer vector can be replicated in *E. coli*, but cannot be replicated in an insect cell. Therefore, it is preferable to replicate many vectors in *E. coli*, and then express them in the insect cell. According to this process, a larger amount of expressed substances can be recovered in comparison with an animal cell.

[0056] The resulting expression plasmid may be transfected into an appropriate host cell, for example, a microorganism cell, such as *E. coli* yeast, or an animal cell, to produce the transformant of the present invention. The method for transfecting the DNA may be, for example, a method of utilizing a competent cell treated with calcium chloride, a protoplast method, a calcium phosphate transfection method, or an electroporation method.

[0057] The pharmaceutical composition of the present invention comprises (1) the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, (2) the human ADAMTS-1 protein variation, or (3) the ADAMTS protein, as an active ingredient. In the pharmaceutical composition of the present invention, the active ingredient may be the mouse ADAMTS-1 protein. The proteins which may be used as the active ingredient of the pharmaceutical composition in the present invention have activities to influence hematopoietic functions, for example, activities to decrease the number of leukocytes and platelets, and at the same time, increase the number of erythrocytes, when administered into a blood vessel.

[0058] It is possible to orally or parenterally administer the pharmaceutical composition according to the present invention, i.e., the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein, alone or preferably together with a pharmaceutically or veterinarily acceptable ordinary carrier, to an animal, preferably a mammal, particularly humans. The formulation is not particularly limited to, but may be, for example, oral medicines, such as powders, fine substaes, granules, tablets, capsules, suspensions, emulsions, syrups, extracts or pills, or parenteral medicines, such as injections, liquids for external use, ointments, suppositories, creams for topical application, or eye lotions.

[0059] The oral medicines may be prepared by an ordinary method using, for example, fillers, binders, disintegrating agents, surfactants, lubricants, flowability-enhancers, diluting agents, preservatives, coloring agents, perfumes, tasting agents, stabilizers, humectants, antiseptics, antioxidants, such as gelatin, sodium alginate, starch, corn starch,

saccharose, lactose, glucose, mannitol, carboxymethylcellulose, dextrin, polyvinyl pyrrolidone, crystalline cellulose, soybean lecithin, sucrose, fatty acid esters (such as glycerin fatty acid ester, sucrose fatty acid ester, sorbitan fatty acid ester, or propyleneglycol fatty acid ester), talc, magnesium stearate, polyethylene glycol, magnesium silicate, silicic anhydride, or synthetic aluminum silicate.

5 [0060] For the parenteral administration, for example, an injection such as a subcutaneous or intravenous injection, or the per rectum administration may be used. Of the parenteral formulations, an injection is preferably used.

[0061] Then the injections are prepared, for example, water-soluble solvents, such as physiological saline or Ringer's solution, water-insoluble solvents, such as plant oil or fatty acid ester, agents for rendering isotonic, such as glucose or sodium chloride, solubilizing agents, stabilizing agents, antiseptics, suspending agents, or emulsifying agents may be optionally used, in addition to the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein.

10 [0062] The pharmaceutical composition may be administered in the form of a sustained release preparation using sustained release polymers. For example, the pharmaceutical composition of the present invention may be incorporated to a pellet made of ethylenevinyl acetate polymers, and the pellet may be surgically implanted in a tissue to be treated.

[0063] The pharmaceutical composition of the present invention may contain the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein in an amount, but not particularly limited to, of 0.0001 to 99% by weight, preferably 0.01 to 80% by weight, more preferably 0.01 to 50% by weight.

20 [0064] When the pharmaceutical composition of the present invention is utilized, the dose is not particularly limited, but varies with the kind of disease, the age, sex, body weight, or symptoms of the subject, a method of administration, or the like. However, the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein may be orally or parenterally administered at a dosage of about 0.0001  $\mu\text{g/kg}$  to 10,000  $\mu\text{g/kg}$ , preferably 0.001  $\mu\text{g/kg}$  to 1,000  $\mu\text{g/kg}$ , more preferably 0.01  $\mu\text{g/kg}$  to 100  $\mu\text{g/kg}$  a day for an adult, usually once or divided into up to four dosages.

25 [0065] The pharmaceutical composition of the present invention may be used not only for the pharmaceutical application but also for various applications. That is, the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein may be administered in the form of functional food or health food, together with a conventional food additive, or directly added to food as a food additive.

[0066] The pharmaceutical composition of the present invention contains the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein variation, or the ADAMTS protein, and thus is useful as, for example, an agent for reducing leukocytes, an agent for reducing platelets, or an agent for increasing erythrocytes.

35 [0067] It is generally known that, when inflammation occurs, leukocytes are activated in blood, move to an inflamed site, evolute and/or cause pathosis. Therefore, it is believed that the human ADAMTS-1 protein of the present invention would be effective in the treatment of various inflammatory diseases, such as rheumatic arthritis, psoriasis, asthma, hepatitis, Kawasaki disease, gout, adult respiratory distress syndrome (ARDS), Crohn's disease, ulcerative colitis, sepsis, or nephritis. Further, the human ADAMTS-1 protein of the present invention exhibits a function to decrease the number of leukocytes and platelets, and thus would be effective in a treatment of true hypervolemia. The human ADAMTS-1 protein of the present invention exhibits a function to decrease the number of platelets. Therefore, it is believed that the human ADAMTS-1 protein of the present invention would exhibit an anti-thrombotic action, and would be effective in the treatment of cardiac infarction, cerebral infarction, or multi-organ failure. The human ADAMTS-1 protein of the present invention exhibits a function to significantly increase the number of erythrocytes, and would be effective in a treatment of anemia, as erythropoietin.

45 [0068] When lipopolysaccharide (LPS), an immunologically stimulating substance, is administered to a mouse (for example, a 10  $\mu\text{g/mouse}$ ), an expression of the mouse ADAMTS-1 gene is superinduced in a heart and a kidney [J. Biol. Chem., 272, 556-562 (1997)]. Therefore, the mouse ADAMTS-1 protein would possibly exhibit a protective function for a heart, and a kidney, upon a lethally acute inflammation such as an endotoxin shock.

50 [0069] Thrombospondin (TSP) is known as a factor for inhibiting vascularization, i.e., specifically inhibiting a growth of endothelial cells [J. Cell. Biol., 111, 765-772 (1990)]. Further, it was reported that the proliferation and metastasis of cancer cells can be inhibited by the induction of TSP in cancer cells [J. Cell. Biol., 111, 765-772 (1990)]. Therefore, the human ADAMTS-1 protein would probably show a function for inhibiting a cancer or metastasis. Further, a recent report had stated that TSP or disintegrin is involved in a bone formation [Biochem. Biophys. Res. Commun., 213, 1017-1025 (1995)]. Therefore, the human ADAMTS-1 protein could be applicable to the treatment of a metabolic bone disease, such as osteoporosis.

55 [0070] The immunologically reactive substance of the present invention specifically reacts the protein containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, particularly the human ADAMTS-1 protein, the human ADAMTS-1 protein

variation, or the ADAMTS protein. The immunologically reactive substance of the present invention includes, for example, an antibody (a monoclonal antibody or a polyclonal antibody), fragments of the antibody, such as, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, or Fv, and an antiserum. The immunologically reactive substance of the present invention specifically reacts the human ADAMTS-1 protein, and therefore, the immunologically reactive substance of the present invention specifically reacts the human ADAMTS-1 protein, and therefore, is useful for analyzing the human ADAMTS-1 protein by immunological ways.

**[0071]** The monoclonal antibody of the present invention may be prepared by a known method, for example, the following method.

**[0072]** A physiological salt solution containing an antigen is mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant or incomplete adjuvant, or an equivalent thereof, such as Hunter's TiterMax™ (Funakoshi; Cat. No. YT001-00, Tokyo, Japan), until emulsified. The resulting emulsion is administered subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, intramuscularly, or intradermally to a mammal, for example, a mouse, rat, rabbit, or hamster, more particularly, a mouse, such as a BALB/c mouse, selected in view of a congeniality to a conventional myeloma cell (a first immunization). Then, the same procedure is repeated at intervals of two to four weeks for several immunizations, and final immunization is carried out using only the antigen solution. The spleens are removed aseptically several days after the final immunization, and spleen cells are prepared.

**[0073]** The resulting spleen cells are used for a cell fusion. The other parent cells used for the cell fusion, that is, the myeloma cells, may be known cell lines, such as, P3X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)], P3X63-Ag8U1 (P3U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], or P3X63Ag8.653 (ATCC deposition No. CRL-1580).

**[0074]** The cell fusion may be carried out by usual methods, for example, the method of Milstein et. al. [Methods in Enzymology, 73, 3-47 (1981)]. The resulting hybridomas are administered to mammals (for example, mice), and desired monoclonal antibodies are separated and purified from ascites of the mammals. The separation and purification method used may be a known method, such as a dialysis ion exchange chromatography using an ammonium sulfate; an affinity column chromatography using a protein A or protein G binding polysaccharides carrier or an anti-mouse immunoglobulin antibody binding polysaccharides carrier; dialysis, or lyophilization.

**[0075]** The polyclonal antibody of the present invention may be prepared by a known method, as indicated below. That is, a physiological salt solution containing an antigen is mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant or incomplete adjuvant, or an equivalent thereof, such as Hunter's TiterMax™ (Funakoshi; Cat. No. YT001-00, Tokyo, Japan), until emulsified. The resulting emulsion is administered subcutaneously, intraperitoneally, or intramuscularly to a mammal, for example, a rabbit, or goat (a first immunization). Then, the same procedure is repeated at intervals of two to four weeks for several immunizations. One or two weeks after a final immunization, blood is taken from a carotid artery or a heart of the mammal, and salted-out with ammonium sulfate to prepare a serum.

**[0076]** The antibody fragment of the present invention may be prepared, for example, by digesting the polyclonal antibody or monoclonal antibody of the present invention with a known protease by a conventional method, and then isolating and purifying by a conventional method.

**[0077]** Production of the human ADAMTS-1 protein is facilitated by an immunologically stimulating substance, such as LPS, and therefore, the human ADAMTS-1 protein may be used as a diagnostic marker of an immunological state in a method for extracorporeally detecting the immunological state. More particularly, the extracorporeally detecting method of the present invention may be applied to a sample taken from a subject to be examined, to thereby detect an immunological state of an immune function of the subject, when the immune function is affected by various diseases, such as inflammation, cancer, cachexia, such as cancer cachexia or infectious disease-related cachexia, infectious disease, or leukemia. If the immune function of the subject is normal, an immunological state corresponding to the immune function can be detected.

**[0078]** The sample which may be used in the present invention is not particularly limited, so long as it has a possibility of including the human ADAMTS-1 protein. The sample may be a biological sample taken from a human, particularly a patient, for example, a humor, such as a tissue (e.g., cells) or an extract therefrom, blood, such as serum, and plasma, urine, or cerebrospinal fluid. A sample used in a conventional clinical examination may be used in the present invention without limitation.

**[0079]** In the analysis step of the human ADAMTS-1 protein in the sample, the sample is first brought into contact with the substance immunologically reactive to the human ADAMTS-1 protein. If the sample does not contain the human ADAMTS-1 protein, a reaction with the immunologically reactive substance does not occur. If the sample contains the human ADAMTS-1 protein, the immunologically reactive substance binds the human ADAMTS-1 protein, and a complex of the immunologically reactive substance and the human ADAMTS-1 protein is formed in an amount correlated with that of the human ADAMTS-1 protein present in the sample. The complex may be easily detected by a known method, and therefore, an existence of the human ADAMTS-1 protein in the sample can be detected by detecting the existence of the complex, or an amount of the human ADAMTS-1 protein in the sample can be measured by measuring the amount of the complex. The human ADAMTS-1 protein in a tissue or a cell may be measured, using a tissue section

sample or a cell sample in a fluorescent antibody technique or an enzyme antibody technique.

[0080] The immunologically reactive substance capable of immunologically reacting the human ADAMTS-1 protein includes an anti-human ADAMTS-1 protein antiserum, an anti-human ADAMTS-1 protein polyclonal antibody, of an anti-human ADAMTS-1 protein monoclonal antibody, or a fragment thereof. The immunologically reactive substance may be used singly or in combination thereof. The fragment includes, for example, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, or Fv.

[0081] In the method for immunologically analyzing the human ADAMTS-1 protein according to the present invention, the sample is brought into contact with the immunologically reactive substance capable of immunologically reacting the human ADAMTS-1 protein, and a complex of the human ADAMTS-1 protein and the immunologically reactive substance is formed. Then, the human ADAMTS-1 protein bound to the antibody is detected and the amount thereof is measured by an immunochemical method, to thereby find a level of the human ADAMTS-1 protein in the sample.

[0082] The immunochemical method principally may be, for example, any conventional immunoassay, for example, EIA, ELISA, RIA or the like. The immunochemical methods are generally classified as follows:

(1) Competitive assay:

[0083] A sample containing an unknown amount of antigens and a given amount of labeled antigens is competitively reacted with a given amount of antibodies, and then an activity of the labeled antigens bound to the antibodies or an activity of the labeled antigens not bound to the antibodies is measured.

(2) Sandwich assay:

[0084] An excess amount of antibodies immobilized on carriers is added and reacted to a sample containing an unknown amount of antigens (a first reaction). Then, a given excess amount of labeled antibodies is added and reacted therewith (a second reaction). An activity of the labeled antibodies on the carriers is measured. Alternatively, an activity of the labeled antibodies which are not on the carriers is measured. The first reaction and the second reaction may be carried out at the same time, or sequentially.

[0085] When a labeling agent is a radioactive isotope, a well counter or a scintillation counter may be used for measurement. When the labeling agent is an enzyme, an enzymatic activity can be measured by colorimetry or fluorimetry, after adding a substrate and allowing to stand. When the labeling agent is a fluorescent substance or a luminescent substance, a known method therefor may be used, respectively.

[0086] In addition to the above methods, recently a western blotting method has been used wherein electrophoresed proteins are transferred onto a filter such as a nitrocellulose membrane, and a target protein is detected with an antibody. The western blotting method may also be used in the detection of the human ADAMTS-1 protein in the present invention.

[0087] The antibody used in the above methods can be labeled with an appropriate marker. Examples are a radioactive isotope, an enzyme, a fluorescent substance, or a luminescent substance, by a known method of labeling antibodies.

[0088] The radioactive isotope may be, for example, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, or <sup>35</sup>S.

[0089] Preferably, the enzyme used is stable and has a large specific activity. Examples of the enzyme are a glycosidase (such as,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -fructosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase, or  $\alpha$ -mannosidase), an amylase (such as,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, isoamylase, glucoamylase, or taka-amylase), a cellulase, or a carbohydrase such as lysozyme; a urease, or an amidase such as asparaginase; a choline esterase, such as acetylcholinesterase, a phosphatase, such as alkaline phosphatase, a sulfatase, an esterase such as lipase; a nuclease such as deoxyribonuclease or ribonuclease; an iron porphyrin enzyme, such as a catalase, peroxidase or cytochrome oxidase; a copper enzyme, such as a tyrosinase or ascorbate oxidase; dehydrogenase, such as an alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, or isocitrate dehydrogenase.

[0090] The fluorescent substance may be, for example, fluorescamine, or a fluorescence isothiocyanate, and the luminescent substance may be, for example, luminol, a luminol derivative, luciferin or lucigenin. A signal from the above lab 1 may be detected by known methods.

[0091] The labeling agent can be bound to antibodies by any conventional method, such as a chloramin T method [Nature, 194, 495-496, (1962)], a periodic acid method [Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091, (1974)], or a maleimide method [Journal of Biochemistry, 79, 233-236, (1976)].

[0092] An EIA method as one of the above measurement methods will be mentioned hereinafter. A sample is added to the first anti-human ADAMTS-1 protein antibodies immobilized on a carrier (such as an assay plate), and the anti-human ADAMTS-1 protein antibodies are bound to the human ADAMTS-1 proteins to form complexes. To the complexes, the second anti-human ADAMTS-1 protein antibodies labeled with enzyme (such as peroxidase) are added to react with the complexes to form "first antibody/human ADAMTS-1 protein/second antibody" complexes. To the resulting "first antibody/human ADAMTS-1 protein/second antibody" complexes, a substrate for the enzyme label (such as

peroxidase) is added, and an absorbance or fluorescent strength of products of the enzymatic reaction is measured, whereby enzymatic activities of the enzyme labels attached to the "first antibody/human ADAMTS-1 protein/second antibody" complexes are measured. A series of the above procedures is carried out in advance for a standard solution containing a known amount of the human ADAMTS-1 protein, and a standard curve based on the relationship between the human ADAMTS-1 protein and the absorbance or fluorescent strength is prepared. A comparison is made between the standard curve and absorbance or fluorescent strength for a sample containing an unknown amount of the human ADAMTS-1 proteins, and the amount of the human ADAMTS-1 proteins in the sample can be measured.

[0093] Another EIA method will be mentioned hereinafter. A sample is brought into contact with a carrier (such as an assay plate) to immobilize the human ADAMTS-1 proteins in the sample onto the carrier. Then, the anti-human ADAMTS-1 protein antibodies (first antibodies) are added thereto to form complexes of the human ADAMTS-1 protein and the first antibody. To the complexes are added anti-first antibody antibodies (second antibodies) labeled with enzyme (such as peroxidase), to react with the complexes to form "human ADAMTS-1 protein/first antibody/second antibody" complexes. To the resulting "human ADAMTS-1 protein/first antibody/second antibody" complexes is added a substrate for the enzyme label (such as peroxidase), and the absorbance or fluorescent strength of products of the enzymatic reaction is measured, whereby enzymatic activities of the enzyme labels attached to the "human ADAMTS-1 protein/first antibody/second antibody" complexes are measured. A series of the above procedures is carried out in advance for a standard solution containing a known amount of the human ADAMTS-1 protein, and a standard curve based on the relationship between the human ADAMTS-1 protein and the absorbance or fluorescent strength is prepared. A comparison is made between the standard curve and the absorbance or fluorescent strength for a sample containing an unknown amount of the human ADAMTS-1 proteins, and the amount of the human ADAMTS-1 proteins in the sample can be measured.

[0094] Further, an RIA method will be mentioned hereinafter. A sample is added to the first anti-human ADAMTS-1 protein antibodies immobilized on a carrier (such as a test tube), and the anti-human ADAMTS-1 protein antibodies are bound to the human ADAMTS-1 proteins to form complexes. To the complexes are added the second anti-human ADAMTS-1 protein antibodies labeled with radioactive isotope (such as  $^{125}\text{I}$ ), to react with the complexes to form "first antibody/human ADAMTS-1 protein/second antibody" complexes. A radioactivity of the resulting "first antibody/human ADAMTS-1 protein/second antibody" complexes is measured. A series of the above procedures is carried out in advance for a standard solution containing a known amount of the human ADAMTS-1 protein, and a standard curve based on the relationship between the human ADAMTS-1 protein and the radioactivity is prepared. A comparison is made between the standard curve and the radioactivity for a sample containing an unknown amount of the human ADAMTS-1 proteins, and the amount of the human ADAMTS-1 proteins in the sample can be measured.

[0095] Another RIA method will be mentioned hereinafter. A sample is brought into contact with a carrier (such as a test tube) to immobilize the human ADAMTS-1 proteins in the sample onto the carrier. Then, the anti-human ADAMTS-1 protein antibodies (first antibodies) are added thereto to form complexes of the human ADAMTS-1 protein and the first antibody. To the complexes are added anti-first antibody antibodies (second antibodies) labeled with radioactive isotope (such as  $^{125}\text{I}$ ), to react with the complexes to form "human ADAMTS-1 protein/first antibody/second antibody" complexes. A radioactivity of the resulting "human ADAMTS-1 protein/first antibody/second antibody" complexes is measured. A series of the above procedures is carried out in advance for a standard solution containing a known amount of the human ADAMTS-1 protein, and a standard curve based on the relationship between the human ADAMTS-1 protein and the radioactivity is prepared. A comparison is made between the standard curve and the radioactivity for a sample containing an unknown amount of the human ADAMTS-1 proteins, and the amount of the human ADAMTS-1 proteins in the sample can be measured.

[0096] In the method for analyzing the mRNA of the human ADAMTS-1 protein in a sample, the sample is reacted with a polynucleotide containing a base sequence complementary to that of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein, and the resulting complex of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein and the polynucleotide is detected, or the amount of the complex is measured to thereby analyze the mRNA of the human ADAMTS-1 protein.

[0097] The polynucleotide contains a sequence complementary or substantially complementary to that of a part of the mRNA transcribed from a selected gene (DNA), and thus forms a double strand with the mRNA transcribed from the target gene. It is believed that any polynucleotide sufficiently complementary to form a stable complex with a target mRNA can be used. The polynucleotide able to be used in the present invention may be complementary to substantially any region in a target mRNA. The polynucleotide can be used as a DNA probe for detecting an increase or a decrease of expression of the mRNA specific to the human ADAMTS-1 protein gene. That is, the polynucleotide is specifically attached to the mRNA of the target human ADAMTS-1 protein, and forms a molecular hybrid, whereby a degree of expression of the human ADAMTS-1 protein in cells can be detected.

[0098] The polynucleotide able to be used in the present invention may be prepared by appropriately selecting a base sequence complementary to a specific base sequence of the mRNA of the target human ADAMTS-1 protein, and using a known DNA synthesizer, a known PCR apparatus, a gene cloning or the like. Various length polynucleotides may be used, but the polynucleotide preferably has 10 or more bases, more preferably 17 or more bases.

[0099] The polynucleotide may be a non-modified polynucleotide or a polynucleotide analogue. An appropriate analogue may be, for example, an ethyl or methyl phosphate analogue, or a phosphorothioated polydeoxynucleotide [Nucleic Acids Res., 14, 9081-9093, (1986); J. Am. Chem. Soc., 106, 6077-6079, (1984)], with recent improvement in the production of polynucleotide analogue, for example, a 2'-O-methylribonucleotide [Nucleic Acids Res., 15, 6131-6148, (1987)], or a conjugated RNA-DNA analogue, i.e., chimera polynucleotide [FEBS Lett., 215, 327-330, (1987)], may be used.

[0100] The selected polynucleotide may be of any kind, for example, may have an electrical charge or no electrical charge. The polynucleotide may be labeled with a known labeling agent, such as a radioactive isotope, or a fluorescent substance by a conventional method, so as to carry out the above experiment in vitro or in vivo. The radioactive isotope may be, for example,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ , or  $^{35}\text{S}$ . Of these radioactive isotopes, it is preferable to label the polynucleotide with  $^{32}\text{P}$  by a random primer method [Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)]. Further, a fluorescent coloring agent forming a derivative may be used as a labeling agent, as this enables an easy handling with a low risk factor. As the fluorescent coloring agent, any coloring agents capable of binding the polynucleotide may be used. For example, fluorescein, rhodamin, Texas red, 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane (NBD), coumarin, fluorecamine, succinyl fluorescein, or dansyl may be preferably used.

[0101] An amount of an mRNA of the human ADAMTS-1 protein may be measured by a northern blotting method, using cDNA of the human ADAMTS-1 protein as follows: an mRNA is extracted and isolated from any somatic cell or tissue, then the isolated mRNA is electrophoresed on an agarose gel and transferred onto a nitro cellulose or nylon membrane, and then reacted with a labeled human ADAMTS-1 protein cDNA probe to measure an amount of the mRNA of the human ADAMTS-1 protein. The human ADAMTS-1 protein cDNA probe used is a DNA complementary to the human ADAMTS-1 protein mRNA, and has preferably 17 or more bases.

[0102] The agent for analyzing an immunological state according to the present invention contains, as a main ingredient, the immunologically reactive substance capable of immunologically reacting the human ADAMTS-1 protein. The immunologically reactive substance capable of immunologically reacting the human ADAMTS-1 protein may be, for example, an anti-human ADAMTS-1 protein antiserum, an anti-human ADAMTS-1 protein polyclonal antibody, or an anti-human ADAMTS-1 protein monoclonal antibody, or a fragment of the antibodies.

[0103] The agent for analyzing an immunological state according to the present invention may contain, as a main ingredient, the polynucleotide containing the base sequence complementary to that of an mRNA of the human ADAMTS-1 protein, instead of the immunologically reactive substance.

[0104] The human ADAMTS-1 protein per se or an mRNA of the human ADAMTS-1 protein in a sample can be analyzed according to the above methods using the agent for analyzing an immunological state according to the present invention, and the immunological state of a subject to be examined, wherein the immune function is affected by various diseases, can be judged from the result.

## EXAMPLES

[0105] The present invention now will be further illustrated by, but is by no means limited to, the following Examples.

### Example 1: Isolation of the human ADAMTS-1 cDNA and determination of the base sequence thereof

[0106] As primers for a PCR method, a DNA [hereinafter referred to as a "forward primer (1)"] having the base sequence (i.e., the base sequence of SEQ ID NO: 4: AGAACCTGTG GTGGTGGAGT TCAATACACA) corresponding to an amino acid sequence (i.e., the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3: Arg Thr Cys Gly Gly Val Gln Tyr Thr) contained in the first thrombospondin (TSP) domain from the N-terminus among three TSP domains of the mouse ADAMTS-1 protein [J. Biol. Chem., 272, 556-562 (1997)], and a DNA [hereinafter referred to as a "back primer (1)"] having the base sequence (i.e., the base sequence of SEQ ID NO: 5: CCTCTTAAGT GCACTGTGTC AGTGTGCAAA AG) complementary to the base sequence encoding amino acids in the C-terminus of the mouse ADAMTS-1 protein and the base sequence in the vicinal regions (i.e., the regions upstream and downstream of the C-terminus) were chemically synthesized.

[0107] To 99  $\mu\text{l}$  of a solution containing 0.5  $\mu\text{M}$  forward primer (1), 0.5  $\mu\text{M}$  back primer (1), 0.5 units of Taq polymerase (Ex Taq polymerase; Takarashuzo, Kyoto, Japan), and 40  $\mu\text{M}$  4dNTP in a PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl] (Ex Taq buffer; Takarashuzo, Kyoto, Japan), 1  $\mu\text{l}$  of a human kidney cDNA library (Marathon-Ready cDNA; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA) was added as a template DNA. A PCR method was performed at an annealing temperature lower than that used in a standard PCR method. That is, the PCR reaction was carried out by repeating a cycle composed of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds, and DNA synthesis at 72°C for 2 minutes, 40 times, i.e., 40 cycles.

[0108] A sample (5  $\mu\text{l}$ ) was taken from the resulting reaction mixture, and electrophoresed on 1% agarose gel. As shown in Fig. 1, a single DNA band of 1.2 Kb was observed. The rest of the reaction mixture was electrophoresed, and

the DNA fragment of 1.2 Kb (hereinafter sometimes referred to as a "Flag. 1 DNA fragment") was recovered from a low-melting-point agarose gel. Then, the Flag. 1 DNA fragment was cloned in a pCR™ 2.1 vector (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA).

[0109] A part (303 bp) of the base sequence of the cloned Flag. 1 DNA fragment was determined by an automatic DNA sequencer (DSQ1000; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). A homology search between the partial base sequence of the cloned Flag. 1 DNA fragment and the base sequence of the mouse ADAMTS-1 was conducted to find that a homology in the base sequences was 77.4%. The partial base sequence of the Flag. 1 DNA fragment and a partial base sequence of the mouse ADAMTS-1 gene having a homology therewith are shown in Fig. 2. The symbol ":" in Fig. 2 means that a base in the Flag. 1 DNA fragment is identical to a corresponding base in the mouse ADAMTS-1 gene.

[0110] Further, a dot hybridization (Biochemistry, 16, 4743-4749 (1977)) was conducted to find that a mouse ADAMTS-1 cDNA labeled with <sup>32</sup>P by a random primed DNA-labeling kit (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was hybridized with the Flag. 1 DNA fragment. The results are shown in Fig. 3. A pCR™2.1 vector as a control was not hybridized with <sup>32</sup>P-labeled mouse ADAMTS-1 cDNA, whereas the mouse ADAMTS-1 cDNA and the Flag. 1 DNA fragment were hybridized with <sup>32</sup>P-labeled mouse ADAMTS-1 cDNA.

[0111] The results of the homology search and dot hybridization mean that the Flag. 1 DNA fragment is a part of the human ADAMTS-1.

[0112] To obtain a DNA fragment upstream of the Flag. 1 DNA fragment, a Rapid amplification of cDNA ends (RACE) method using a Marathon cDNA Amplification kit (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA) was performed as follows. That is, as back primers for the base sequence of the Flag. 1 DNA fragment, a DNA primer (hereinafter sometimes referred to as a "GSP-1 primer") having the base sequence (i.e., the base sequence of SEQ ID NO: 6: CCTCT-TAACT GCACTGTGTC AGT) complementary to the base sequence of the 3'-end region of the Flag. 1 DNA fragment, and a DNA primer (hereinafter sometimes referred to as a "GSP-2 primer") having the base sequence (i.e., the base sequence of SEQ ID NO: 7: CAGGCCCACT CCCAAAGGAA GCTT) complementary to the base sequence of the 5'-end region of the Flag. 1 DNA fragment were chemically synthesized. As forward primers, an AP1 primer and an AP2 primer attached to the above kit were used. The AP1 primer had the base sequence of SEQ ID NO: 8: CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC, and the AP2 primer had the base sequence of SEQ ID NO: 9: ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC.

[0113] After 5 µl of a human kidney cDNA library (Marathon-Ready cDNA; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), 1 µl of the AP1 primer, 1 µl of 10 µM GSP-1 primer, 1 µl of a Tag polymerase (0.5 unit; Ex Taq polymerase), 1 µl of an anti-Taq polymerase antibody (Taq Start Antibody; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), 5 µl of a PCR buffer having a 10-fold concentration [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mM KCl] (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), and 36 µl of distilled water were mixed, a PCR reaction was performed. The PCR reaction was carried out by repeating a cycle composed of a step at 94°C for 30 seconds and a step at 68°C for 4 minutes, 35 times, i.e., 35 cycles. The resulting reaction mixture was diluted to 50-fold with 10 mM Tricine-EDTA buffer (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA).

[0114] Then, 5 µl of the diluted liquid, 1 µl of the AP2 primer, 1 µl of a 10 µM GSP-2 primer, 1 µl of a Taq polymerase (0.5 unit; Ex Taq polymerase), 1 µl of an anti-Taq polymerase antibody (Taq Start Antibody), 5 µl of a PCR buffer having a 10-fold concentration (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), and 36 µl of distilled water were mixed, and a PCR reaction was then performed. The PCR reaction was carried out by repeating a cycle composed of a step at 94°C for 30 seconds and a step at 68°C for 4 minutes 20 times, i.e., 20 cycles.

[0115] A sample (5 µl) was taken from the resulting reaction mixture, and electrophoresed on 1% agarose gel. As shown in Fig. 4, a single DNA band of about 1.2 Kb was observed. The DNA fragment (hereinafter sometimes referred to as a "Flag. 2 DNA fragment") was cloned in a pCR™ 2.1 vector by a conventional method, and the full-length base sequence of the Flag. 2 DNA fragment determined by a Dye Terminator Cycle Sequencing method (Perkin Elmer Japan, Urayasu, Japan).

[0116] Further, the full-length base sequence of the Flag. 1 DNA fragment was determined by the Dye Terminator Cycle Sequencing method (Perkin Elmer Japan, Urayasu, Japan). From the obtained base sequences of the Flag. 1 DNA fragment and the Flag. 2 DNA fragment, the full-length base sequence of the human ADAMTS-1 cDNA was determined. The full-length base sequence (2184 bp including a stop codon) is shown in SEQ ID NO: 2 and the amino acid sequence (727 amino acid residues) of the human ADAMTS-1 protein deduced from the above base sequence is shown in SEQ ID NO: 1. The partial base sequence of the Flag. 1 DNA fragment as shown in Fig. 2 contains some bases not identical to the full-length base sequence of the human ADAMTS-1 cDNA (SEQ ID NO: 2). However, the partial base sequence as shown in Fig. 2 was an interim sequence obtained in the process of determining the base sequence. The base sequence of SEQ ID NO: 2 is a correct base sequence of the human ADAMTS-1 cDNA which has been finally determined.

[0117] The human ADAMTS-1 protein is cysteine-rich, and contains many basic amino acids such as lysine and arginine in the C-terminal region, and two N-glycosylation sites (the 307th to 309th amino acids and 524th to 526th amino acids).



[0118] The homology between the base sequences of the human ADAMTS-1 gene and the mouse ADAMTS-1 gene is shown in Figs. 5 to 9, and the homology in the amino acid sequences deduced from the base sequences is shown in Figs. 10 to 12.

[0119] In Figs. 5 to 9, the symbol "\*" means that a base of the human ADAMTS-1 gene is identical to the corresponding base of the mouse ADAMTS-1 gene.

[0120] In Figs. 10 to 12, the symbol "\*" means that an amino acid residue of the human ADAMTS-1 protein is identical to the corresponding amino acid residue of the mouse ADAMTS-1 protein. In Figs. 10 to 12, "MMP domain" means a matrix metalloproteinase domain; the line between the 11th and 12th amino acids indicates the starting site of the matrix metalloproteinase domain; "DI domain" means the disintegrin domain; the line between the 234th and 235th amino acids indicates the starting site of the disintegrin domain; "TSP domain" means the thrombospondin domain; and amino acid sequences in boxes (three occurrences) mean the thrombospondin domain.

[0121] The homology in the base sequences between the human ADAMTS-1 and the mouse ADAMTS-1 was 85.5% and that in the amino acid sequences was 90.1%. The results show that ADAMTS-1 is the protein of which, between mouse and human, the sequences have been preserved.

#### Example 2: Preparation of the human ADAMTS-1 fusion protein in *E. coli*

##### (1) Construction of an expression vector for *E. coli*

[0122] To introduce a *Sma*I site at the 5'-side and a *Not*I site at the 3'-side into the DNA encoding a partial region downstream of the MMP domain in the full-length human ADAMTS-1 protein, a forward primer (2) having the base sequence of SEQ ID NO: 10:

CACCCCGGGA GGAAGAAGCG ATTTGTGTCC AGCCCCGTT ATG,

and a back primer (2) having the base sequence of SEQ ID NO: 11:

GTGCGCGCCG CCCTCTTAAC TGA CTGTGT. CAGTGTGCAA AA

were chemically synthesized.

[0123] After 5  $\mu$ l of the forward primer (2), 5  $\mu$ l of the back primer (2), 1  $\mu$ l of a human kidney cDNA library (Marathon-Ready cDNA; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), 1  $\mu$ l of a Taq polymerase (0.5 unit; Ex Taq polymerase), 1  $\mu$ l of an anti-Taq polymerase antibody (Taq Start Antibody; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), 10  $\mu$ l of a PCR buffer having a 10-fold concentration (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA), 8  $\mu$ l of 2.5 mM 4dNTP (Takarashuzo, Kyoto, Japan), and 69  $\mu$ l of distilled water were mixed, a PCR reaction was performed. The PCR reaction was carried out by repeating a cycle composed of a step at 94°C for 1 minute, a step at 55°C for 45 seconds, and a step at 72°C for 2 seconds 40 times, i.e., 40 cycles.

[0124] A sample (5  $\mu$ l) was taken from the resulting reaction mixture, and electrophoresed on 1% agarose gel. As shown in Fig. 13, a single DNA band of about 2.2 Kb was obtained. The DNA fragment of about 2.2 Kb was cloned in the pCR™ 2.1 vector by a conventional method, and a large quantity of the plasmids produced [Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)]. The resulting plasmids prepared on a large scale were treated with restriction enzymes, *Sma*I (Takarashuzo, Kyoto, Japan) and *Not*I (Takarashuzo, Kyoto, Japan) to obtain a DNA fragment of about 2.2 Kb. The DNA fragment of about 2.2 Kb was cloned in a *Sma*I-*Not*I site of an expression vector for *E. coli* pGEX-5X-1 [Infect Immun., 58, 3909-3913 (1990)] (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The resulting expression plasmid was named pG/ADAMTS-1. The structure of the plasmid pG/ADAMTS-1 is schematically shown in Fig. 14. It is believed that the ADAMTS-1 protein is expressed in the form of a fusion protein (molecular weight = about 96 Kd) with a glutathione-S-transferase (hereinafter sometimes referred to as a "GST") (molecular weight = about 26 Kd). In Fig. 14, "Ori" means a replication origin, "Amp<sup>R</sup>" means an ampicillin resistance gene, and "Iaq I<sup>R</sup>" means a Iaq repressor.

##### (2) Expression of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein in *E. coli*

[0125] The plasmid pG/ADAMTS-1 was introduced into an *E. coli* BL-21 strain having a low protease activity (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) by a conventional method [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114 (1972)]. *E. coli* clones containing the plasmid were isolated as ampicillin resistance strains. Five ampicillin resistance strains (hereinafter referred to as "clone #1" to "clone #5") randomly selected from the strains were used to inoculate 2 ml of 2xYT medium (prepared by dissolving 16 g of trypton, 10 g of yeast extract, and 5g of NaCl in 1 liter of distilled water; pH 7.2), and cultured overnight at 37°C. Then, a set of two test tubes containing 1800  $\mu$ l of an LB culture medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml) was prepared for each clone. To each test tube, 200  $\mu$ l of the overnight culture was poured. Then after incubating at 37°C for 2 hours, 20  $\mu$ l (final concentration = 1.0 mM) of isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranoside (IPTG) (Takarashuzo, Tokyo, Japan), an expression-inducer, was added to one of the two test tubes. Thereafter, the test tubes were incubated at 37°C for 2 hours. The expression-inducer was not added to the other test tube, which was used as a control.



[0126] Microorganisms were harvested by centrifugation (14000 rpm, 1 minute) from 1 ml of the culture, using a microcentrifuging apparatus, then suspended in 100  $\mu$ l of a phosphate-buffered solution (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH 7.2; hereinafter referred to as a PBS) and thereafter dissolved in 100  $\mu$ l of a 2 $\times$ sample buffer (0.25M Tris-HCl, 2% SDS, 3% glycerol, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue; pH 6.8). The resulting solution (10  $\mu$ l) was subjected to an SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (hereinafter sometimes referred to as an "SDS-PAGE"), and an expression induction of the desired protein was confirmed by a Coomassie staining method.

[0127] The results are shown in Fig. 15 wherein "+" lanes show the results of the electrophoresis of E coli incubated with the expression inducer, IPTG, and "-" lanes show the results of the electrophoresis of E coli incubated without the expression inducer, IPTG. In each "+" lane, a protein having a molecular weight of about 100 Kd was observed. This is identical to an expected molecular weight of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein, i.e., about 96 Kd. However, such a protein was not observed in the "-" lanes.

[0128] Of five clones ("clone #1" to "clone #5"), the clone #2 exhibited the highest expression, and thus was used in the following Examples.

### (3) Extraction and isolation of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein

[0129] After overnight incubation, 1 ml of the culture of the clone #2 was added to 100 ml of a 2 $\times$ YT culture medium containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin, and incubated at 37°C. When an absorbance at 600 nm reached about 0.5, 1 ml of a 100 mM IPTG was added to the culture, and then incubation was continued for 2 hours.

[0130] E. coli was harvested by centrifugation (3000 rpm, 30 minutes) from the culture, and then suspended in 8 ml of PBS. To the suspension, 1 ml of 0.5M EDTA solution and 1 ml of 25 mg/ml lysozyme solution were added, and the whole was allowed to stand in ice for 30 minutes. After 110  $\mu$ l of Triton X-100 was added, the microorganisms were disrupted on ice by a sonicator (TAITEC, Koshigaya, Japan). The disruption liquid was centrifuged (8000 rpm, 4°C, 10 minutes), then the resulting precipitate suspended in 30 ml of PBS containing 1.0% Triton X-100, and thereafter centrifuged (8000 rpm, 4°C, 10 minutes).

[0131] The resulting precipitate was suspended in 2 ml of a 10 mM EDTA solution, and then, 50 ml of a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 8 M urea and 1% mercaptoethanol was added. After a thorough admixing, the mixture was centrifuged (15000 rpm, 4°C, 5 minutes). The resulting supernatant was dialyzed against 5 liters of a 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) at 4°C. The dialyzed solution was centrifuged (15000 rpm, 4°C, 5 minutes), and the resulting supernatant then adsorbed to an anion chromatography (Econo-Pac High Q; Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA). Fractions eluted with 0.2 to 0.4 M NaCl were dialyzed against 3 liters of PBS, and then adsorbed to 1 ml of glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)].

[0132] The glutathione Sepharose 4B was washed with 50 ml of PBS, and then eluted with 8 ml of 10 mM glutathione solution [Nucleic Acids Res., 9, 2989-2998 (1981)]. Fractions exhibiting a high GST activity detected by a GST detecting kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) were pooled.

[0133] A part of the fractions was subjected to an SDS-PAGE, and a Coomassie staining was performed. As shown in Fig. 16, a GST-human ADAMTS-1 fusion protein was confirmed from the molecular weight. The desired protein (about 1  $\mu$ g) was extracted and purified from 100 ml of E. coli culture.

[0134] The resulting fusion protein contains a site which may be broken with a Factor Xa or the like, between the GST and the human ADAMTS-1 protein, and therefore, the human ADAMTS-1 protein can be obtained by digesting the fusion protein with the proteinase. The human ADAMTS-1 protein may be used as an antigen to prepare an antibody.

### Example 3: Examination of activities of GST-human ADAMTS-1 fusion protein on influencing hematopoietic functions

[0135] To examine the activities of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein on influencing hematopoietic functions, a large-scale preparation of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein was carried out in accordance with the process disclosed in Example 2 (3), and about 30  $\mu$ g of the desired protein was obtained from 3 liters of E. coli culture.

[0136] The functions thought to influence the number of blood cells by a single dosage of the GST-human ADAMTS-1 fusion protein to a tail vein of a mouse were examined, as the activities influencing hematopoietic functions. The examining system can be conducted with a small amount of a protein to be examined, and enables a quick elucidation of a biological activity. In a control test, a GST protein extracted and purified by the process disclosed in Example 2(3) from E. coli transformed with a vector pGEX-5X-1 was used.

[0137] The GST-human ADAMTS-1 fusion protein (1  $\mu$ g) was administered to eight C<sub>57</sub>BL/6N mice (Charles river Japan, Yokohama, Japan) (male, 7 weeks old) at a tail vein. The numbers of leukocytes, erythrocytes, and platelets were counted 3 hours and 24 hours after the administration. In the control test, the GST protein (1  $\mu$ g) was administered to eight C<sub>57</sub>BL/6N mice (Charles river Japan, Yokohama, Japan) (male, 7 weeks old) at a tail vein. The numbers of leukocytes, erythrocytes, and platelets were counted 3 hours and 24 hours after the administration.

**[0138]** The results are shown in Fig. 17. It is apparent from Fig. 17 that the number of leukocytes and platelets is significantly decreased, and the number of erythrocytes is significantly increased in the mice to which the GST-human ADAMTS-1 fusion protein was administered, in comparison with the control tests.

5 INDUSTRIAL APPLICABILITY

**[0139]** According to the protein of the present invention, hematopoietic functions can be controlled, for example, the number of leukocytes and platelets can be decreased, and at the same time, the number of erythrocytes can be increased.

10 **[0140]** As above, the present invention is explained with reference to particular embodiments, but modifications and improvements obvious to those skilled in the art are included in the scope of the present invention.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 004 674 A1

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1

SEQUENCE LENGTH: 727

SEQUENCE TYPE: amino acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser

5 10 15

Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu

20 25 30

Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val

35 40 45

Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu

50 55 60

Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu

65 70 75 80

Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln

85 90 95

Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr

100 105 110

Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp

115 120 125

Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser

130 135 140

Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala

145 150 155 160

His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln

165 170 175

EP 1 004 674 A1

Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
180 185 190  
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
195 200 205  
Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
210 215 220  
Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
225 230 235 240  
Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
245 250 255  
Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
260 265 270  
Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
275 280 275  
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
290 295 300  
Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
305 310 315 320  
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
325 330 335  
Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
340 345 350  
Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
355 360 365  
Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
370 375 380

EP 1 004 674 A1

5 Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp  
 405 410 415  
 10 Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
 420 425 430  
 15 Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
 435 440 445  
 Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
 20 450 455 460  
 Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
 25 465 470 475 480  
 Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro  
 485 490 495  
 30 Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu  
 500 505 510  
 35 Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu  
 515 520 525  
 Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
 40 530 535 540  
 Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
 45 545 550 555 560  
 Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
 565 570 575  
 50 Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
 580 585 590  
 55

EP 1 004 674 A1

Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser

595

600

605

Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly

610

615

620

Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu

625

630

635

640

Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val

645

650

655

Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp

660

665

670

Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr

675

680

685

Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser

690

695

700

His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe

705

710

715

720

Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser

725

SEQ ID NO: 2

SEQUENCE LENGTH: 2184

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC 48

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser

5

10

15

EP 1 004 674 A1

	CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA	96
5	Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu	
	20 25 30	
10	TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG	144
	Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val	
	35 40 45	
15	GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG	192
	Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu	
20	50 55 60	
	GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA	240
25	Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu	
	65 70 75 80	
30	GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG	288
	Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln	
	85 90 95	
35	AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA	336
	Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr	
40	100 105 110	
	GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT	384
	Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp	
45	115 120 125	
	ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC	432
50	Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser	
	130 135 140	

55

5 TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC 480  
 Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala  
 145 150 155 160  
 10 CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG 528  
 His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
 165 170 175  
 15 TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA 576  
 Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
 20 180 185 190  
 ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC 624  
 Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
 25 195 200 205  
 TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG 672  
 Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
 30 210 215 220  
 35 GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GCC GAT CTC CCT GCC ACC 720  
 Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
 40 225 230 235 240  
 TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC 768  
 Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
 45 245 250 255  
 AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC 816  
 50 Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
 260 265 270

55



EP 1 004 674 A1

	GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG	864
5	Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp	
	275 280 275	
10	GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG	912
	Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys	
	290 295 300	
15	TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA	960
	Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly	
20	305 310 315 320	
	AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT	1008
25	Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly	
	325 330 335	
30	GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG	1056
	Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys	
	340 345 350	
35	AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CGA GTG CGC TAC AGA TCC TGT	1104
	Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys	
40	355 360 365	
	AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA	1152
45	Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu	
	370 375 380	
50	CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG	1200
	Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly	
	385 390 395 400	
55		

EP 1 004 674 A1

	CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC	1248
5	Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp	
	405 410 415	
10	AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT	1296
	Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val	
	420 425 430	
15	TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC	1344
	Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr	
20	435 440 445	
25	TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC	1392
	Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile	
	450 455 460	
30	ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT	1440
	Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn	
	465 470 475 480	
35	GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT	1488
	Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro	
40	485 490 495	
45	GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA	1536
	Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu	
	500 505 510	
50	GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT	1584
	Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu	
	515 520 525	

EP 1 004 674 A1

5 GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT 1632  
 Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
 530 535 540  
 10 TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG 1680  
 Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
 545 550 555 560  
 15 TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT 1728  
 Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
 20 565 570 575  
 CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT 1776  
 25 Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
 580 585 590  
 30 CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT 1824  
 Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser  
 595 600 605  
 35 TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC 1872  
 Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly  
 40 610 615 620  
 GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA 1920  
 Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
 45 625 630 635 640  
 50 TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG 1968  
 Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
 645 650 655  
 55

EP 1 004 674 A1

5 AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG 2016  
 Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
 660 665 670  
 10 CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC 2064  
 Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
 675 680 685  
 15 AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT 2112  
 Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
 690 695 700  
 20 CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT 2160  
 His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
 705 710 715 720  
 25 TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA 2184  
 Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser  
 30 725

35 SEQ ID NO: 3  
 SEQUENCE LENGTH: 10  
 SEQUENCE TYPE: amino acid  
 SEQUENCE DESCRIPTION:  
 40 Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Tyr Thr  
 5 10

45 SEQ ID NO: 4  
 SEQUENCE LENGTH: 30  
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid  
 50 SEQUENCE DESCRIPTION:  
 AGAACCTGTG GTGGTGGAGT TCAATACACA 30

55

SEQ ID NO: 5

SEQUENCE LENGTH: 32

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

CCTCTTAACT GCACTGTGTC AGTGTGCAAA AG

32

SEQ ID NO: 6

SEQUENCE LENGTH: 23

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

CCTCTTAACT GCACTGTGTC AGT

23

SEQ ID NO: 7

SEQUENCE LENGTH: 24

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

CAGGCCCACT CCCAAAGGAA GCTT

24

SEQ ID NO: 8

SEQUENCE LENGTH: 27

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

SEQ ID NO: 9

SEQUENCE LENGTH: 23

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

SEQ ID NO: 10

SEQUENCE LENGTH: 43

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

CACCCCGGGA GGAAGAAGCG ATTTGTGTCC AGCCCCCGTT ATG

43

SEQ ID NO: 11

SEQUENCE LENGTH: 42

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

SEQUENCE DESCRIPTION:

GTGGCGGCCG CCCTCTTAAC TGCAGTGTGT CAGTGTGCAA AA

42

**Claims**

1. A protein characterized by containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1:

Met Asp Ile Cys Arg Ile Arg Leu Arg Lys Lys Arg Phe Val Ser Ser  
5 Pro Arg Tyr Val Glu Thr Met Leu Val Ala Asp Gln Ser Met Ala Glu  
Phe His Gly Ser Gly Leu Lys His Tyr Leu Leu Thr Leu Phe Ser Val  
Ala Ala Arg Leu Tyr Lys His Pro Ser Ile Arg Asn Ser Val Ser Leu  
10 Val Val Val Lys Ile Leu Val Ile His Asp Glu Gln Lys Gly Pro Glu  
Val Thr Ser Asn Ala Ala Leu Thr Leu Arg Asn Phe Cys Asn Trp Gln  
15 Lys Gln His Asn Pro Pro Ser Asp Arg Asp Ala Glu His Tyr Asp Thr  
Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp Leu Cys Gly Ser Gln Thr Cys Asp  
20 Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly Thr Val Cys Asp Pro Ser Arg Ser  
Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Thr Ala  
His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Ala Lys Gln  
25 Cys Ala Ser Leu Asn Gly Val Asn Gln Asp Ser His Met Met Ala Ser  
Met Leu Ser Asn Leu Asp His Ser Gln Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala  
30 Tyr Met Ile Thr Ser Phe Leu Asp Asn Gly His Gly Glu Cys Leu Met  
Asp Lys Pro Gln Asn Pro Ile Gln Leu Pro Gly Asp Leu Pro Gly Thr  
35 Leu Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Cys Gln Phe Thr Phe Gly Glu Asp Ser  
Lys His Cys Pro Asp Ala Ala Ser Thr Cys Ser Thr Leu Trp Cys Thr  
40 Gly Thr Ser Gly Gly Val Leu Val Cys Gln Thr Lys His Phe Pro Trp  
Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly Lys Trp Cys Ile Asn Gly Lys  
45 Cys Val Asn Lys Thr Asp Arg Lys His Phe Asp Thr Pro Phe His Gly  
Ser Trp Gly Pro Trp Gly Pro Trp Gly Asp Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
Gly Gly Val Gln Tyr Thr Met Arg Glu Cys Asp Asn Pro Val Pro Lys  
50 Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Lys Arg Val Arg Tyr Arg Ser Cys  
55

Asn Leu Glu Asp Cys Pro Asp Asn Asn Gly Lys Thr Phe Arg Glu Glu  
 5 Gln Cys Glu Ala His Asn Glu Phe Ser Lys Ala Ser Phe Gly Ser Gly  
 Pro Ala Val Glu Trp Ile Pro Lys Tyr Ala Gly Val Ser Pro Lys Asp  
 10 Arg Cys Lys Leu Ile Cys Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Phe Phe Val  
 Leu Gln Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asp Ser Thr  
 Ser Val Cys Val Gln Gly Gln Cys Val Lys Ala Gly Cys Asp Arg Ile  
 15 Ile Asp Ser Lys Lys Lys Phe Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asn  
 Gly Ser Thr Cys Lys Lys Ile Ser Gly Ser Val Thr Ser Ala Lys Pro  
 20 Gly Tyr His Asp Ile Val Thr Ile Pro Thr Gly Ala Thr Asn Ile Glu  
 Val Lys Gln Arg Asn Gln Arg Gly Ser Arg Asn Asn Gly Ser Phe Leu  
 25 Ala Ile Lys Ala Ala Asp Gly Thr Tyr Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Thr  
 Leu Ser Thr Leu Glu Gln Asp Ile Met Tyr Lys Gly Val Val Leu Arg  
 Tyr Ser Gly Ser Ser Ala Ala Leu Glu Arg Ile Arg Ser Phe Ser Pro  
 30 Leu Lys Glu Pro Leu Thr Ile Gln Val Leu Thr Val Gly Asn Ala Leu  
 Arg Pro Lys Ile Lys Tyr Thr Tyr Phe Val Lys Lys Lys Lys Glu Ser  
 35 Phe Asn Ala Ile Pro Thr Phe Ser Ala Trp Val Ile Glu Glu Trp Gly  
 Glu Cys Ser Lys Ser Cys Glu Leu Gly Trp Gln Arg Arg Leu Val Glu  
 40 Cys Arg Asp Ile Asn Gly Gln Pro Ala Ser Glu Cys Ala Lys Glu Val  
 Lys Pro Ala Ser Thr Arg Pro Cys Ala Asp His Pro Cys Pro Gln Trp  
 45 Gln Leu Gly Glu Trp Ser Ser Cys Ser Lys Thr Cys Gly Lys Gly Tyr  
 Lys Lys Arg Ser Leu Lys Cys Leu Ser His Asp Gly Gly Val Leu Ser  
 His Glu Ser Cys Asp Pro Leu Lys Lys Pro Lys His Phe Ile Asp Phe  
 50 Cys Thr Leu Thr Gln Cys Ser.

- 55
2. A variation functionally equivalent to a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
  3. A protein characterized by containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a throm-



**EP 1 004 674 A1**

bospondin domain, except for a mouse ADAMTS-1 protein.

4. A gene characterized by encoding said protein according to any one of claims 1 to 3.

5 5. A gene containing a base sequence of SEQ ID NO: 2:

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

ATG GAT ATC TGC AGA ATT CGG CTT AGG AAG AAG CGA TTT GTG TCC AGC  
5 CCC CGT TAT GTG GAA ACC ATG CTT GTG GCA GAC CAG TCG ATG GCA GAA  
TTC CAC GGC AGT GGT CTA AAG CAT TAC CTT CTC ACG TTG TTT TCG GTG  
10 GCA GCC AGA TTG TAC AAA CAC CCC AGC ATT CGT AAT TCA GTT AGC CTG  
GTG GTG GTG AAG ATC TTG GTC ATC CAC GAT GAA CAG AAG GGG CCG GAA  
GTG ACC TCC AAT GCT GCC CTC ACT CTG CGG AAC TTT TGC AAC TGG CAG  
15 AAG CAG CAC AAC CCA CCC AGT GAC CGG GAT GCA GAG CAC TAT GAC ACA  
GCA ATT CTT TTC ACC AGA CAG GAC TTG TGT GGG TCC CAG ACA TGT GAT  
20 ACT CTT GGG ATG GCT GAT GTT GGA ACT GTG TGT GAT CCG AGC AGA AGC  
TGC TCC GTC ATA GAA GAT GAT GGT TTA CAA GCT GCC TTC ACC ACA GCC  
CAT GAA TTA GGC CAC GTG TTT AAC ATG CCA CAT GAT GAT GCA AAG CAG  
25 TGT GCC AGC CTT AAT GGT GTG AAC CAG GAT TCC CAC ATG ATG GCG TCA  
ATG CTT TCC AAC CTG GAC CAC AGC CAG CCT TGG TCT CCT TGC AGT GCC  
30 TAC ATG ATT ACA TCA TTT CTG GAT AAT GGT CAT GGG GAA TGT TTG ATG  
GAC AAG CCT CAG AAT CCC ATA CAG CTC CCA GGC GAT CTC CCT GGC ACC  
35 TTG TAC GAT GCC AAC CGG CAG TGC CAG TTT ACA TTT GGG GAG GAC TCC  
AAA CAC TGC CCC GAT GCA GCC AGC ACA TGT AGC ACC TTG TGG TGT ACC  
GGC ACC TCT GGT GGG GTG CTG GTG TGT CAA ACC AAA CAC TTC CCG TGG  
40 GCG GAT GGC ACC AGC TGT GGA GAA GGG AAA TGG TGT ATC AAC GGC AAG  
TGT GTG AAC AAA ACC GAC AGG AAG CAT TTT GAT ACG CCT TTT CAT GGA  
45 AGC TGG GGA CCA TGG GGA CCG TGG GGA GAC TGT TCG AGA ACG TGC GGT  
GGA GGA GTC CAG TAC ACG ATG AGG GAA TGT GAC AAC CCA GTC CCA AAG  
50 AAT GGA GGG AAG TAC TGT GAA GGC AAA CCA GTG CGC TAC AGA TCC TGT  
AAC CTT GAG GAC TGT CCA GAC AAT AAT GGA AAA ACC TTT AGA GAG GAA  
55

CAA TGT GAA GCA CAC AAC GAG TTT TCA AAA GCT TCC TTT GGG AGT GGG  
 5 CCT GCG GTG GAA TGG ATT CCC AAG TAC GCT GGC GTC TCA CCA AAG GAC  
 AGG TGC AAG CTC ATC TGC CAA GCC AAA GGC ATT GGC TAC TTC TTC GTT  
 10 TTG CAG CCC AAG GTT GTT GAT GGT ACT CCA TGT AGC CCA GAT TCC ACC  
 TCT GTC TGT GTG CAA GGA CAG TGT GTA AAA GCT GGT TGT GAT CGC ATC  
 ATA GAC TCC AAA AAG AAG TTT GAT AAA TGT GGT GTT TGC GGG GGA AAT  
 15 GGA TCT ACT TGT AAA AAA ATA TCA GGA TCA GTT ACT AGT GCA AAA CCT  
 GGA TAT CAT GAT ATC GTC ACA ATT CCA ACT GGA GCC ACC AAC ATC GAA  
 20 GTG AAA CAG CGG AAC CAG AGG GGA TCC AGG AAC AAT GGC AGC TTT CTT  
 GCC ATC AAA GCT GCT GAT GGC ACA TAT ATT CTT AAT GGT GAC TAC ACT  
 25 TTG TCC ACC TTA GAG CAA GAC ATT ATG TAC AAA GGT GTT GTC TTG AGG  
 TAC AGC GGC TCC TCT GCG GCA TTG GAA AGA ATT CGC AGC TTT AGC CCT  
 CTC AAA GAG CCC TTG ACC ATC CAG GTT CTT ACT GTG GGC AAT GCC CTT  
 30 CGA CCT AAA ATT AAA TAC ACC TAC TTC GTA AAG AAG AAG AAG GAA TCT  
 TTC AAT GCT ATC CCC ACT TTT TCA GCA TGG GTC ATT GAA GAG TGG GGC  
 35 GAA TGT TCT AAG TCA TGT GAA TTG GGT TGG CAG AGA AGA CTG GTA GAA  
 TGC CGA GAC ATT AAT GGA CAG CCT GCT TCC GAG TGT GCA AAG GAA GTG  
 40 AAG CCA GCC AGC ACC AGA CCT TGT GCA GAC CAT CCC TGC CCC CAG TGG  
 CAG CTG GGG GAG TGG TCA TCA TGT TCT AAG ACC TGT GGG AAG GGT TAC  
 45 AAA AAA AGA AGC TTG AAG TGT CTG TCC CAT GAT GGA GGG GTG TTA TCT  
 CAT GAG AGC TGT GAT CCT TTA AAG AAA CCT AAA CAT TTC ATA GAC TTT  
 50 TGC ACA CTG ACA CAG TGC AGT TAA.

6. A vector characterized by containing said gene according to claim 4 or 5.
7. A transformant characterized by being transformed by said vector according to claim 6.
8. A pharmaceutical composition characterized by comprising

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,
  - (2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or
  - (3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain, and
- a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier.

9. The pharmaceutical composition according to claim 8, for reducing leukocytes.

10. The pharmaceutical composition according to claim 8, for reducing platelets.

11. The pharmaceutical composition according to claim 8, for increasing erythrocytes.

12. A food characterized by comprising

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,
- (2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or
- (3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain, and a food additive.

13. A food additive characterized by comprising

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,
- (2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or
- (3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain.

14. An immunologically reactive substance characterized by being reactive specifically to said protein according to any one of claims 1 to 3.

15. A method for immunologically analyzing a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, characterized in that a sample is brought into contact with an immunologically reactive substance which is reactive specifically to said human ADAMTS-1 protein, and a complex of said human ADAMTS-1 protein and said immunologically reactive substance is detected.

16. A method for extracorporeally detecting an immunological state, characterized by analyzing a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 in a sample.

17. A method for immunologically analyzing an mRNA of a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, characterized in that a sample is brought into contact with a polynucleotide containing a base sequence complementary to that of said mRNA of said human ADAMTS-1 protein, and a complex of said mRNA of said human ADAMTS-1 protein and said gene is detected.

18. A method for extracorporeally detecting an immunological state, characterized by analyzing an mRNA of a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 in a sample.

19. An agent for analyzing an immunological state, characterized by containing an immunologically reactive substance capable of immunologically reacting a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

20. An agent for analyzing an immunological state, characterized by containing a polynucleotide containing a base sequence complementary to that of an mRNA of a human ADAMTS-1 protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

21. A method for reducing leukocytes, comprising administering to a subject in need thereof,

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,
- (2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or
- (3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin

domain,  
an an amount effective therefor.

22. A method for reducing platelets, comprising administering to a subject in need thereof,

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,  
(2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or  
(3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain,  
in an amount effective therefor.

23. A method for increasing erythrocytes, comprising administering to a subject in need thereof,

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,  
(2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or  
(3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain,  
in an amount effective therefor.

24. Use of

- (1) a protein containing an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1,  
(2) a variation functionally equivalent to said protein containing said amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or  
(3) a protein containing a matrix metalloproteinase domain, a disintegrin domain, and a thrombospondin domain,  
for preparing a pharmaceutical composition.

FIG. 1

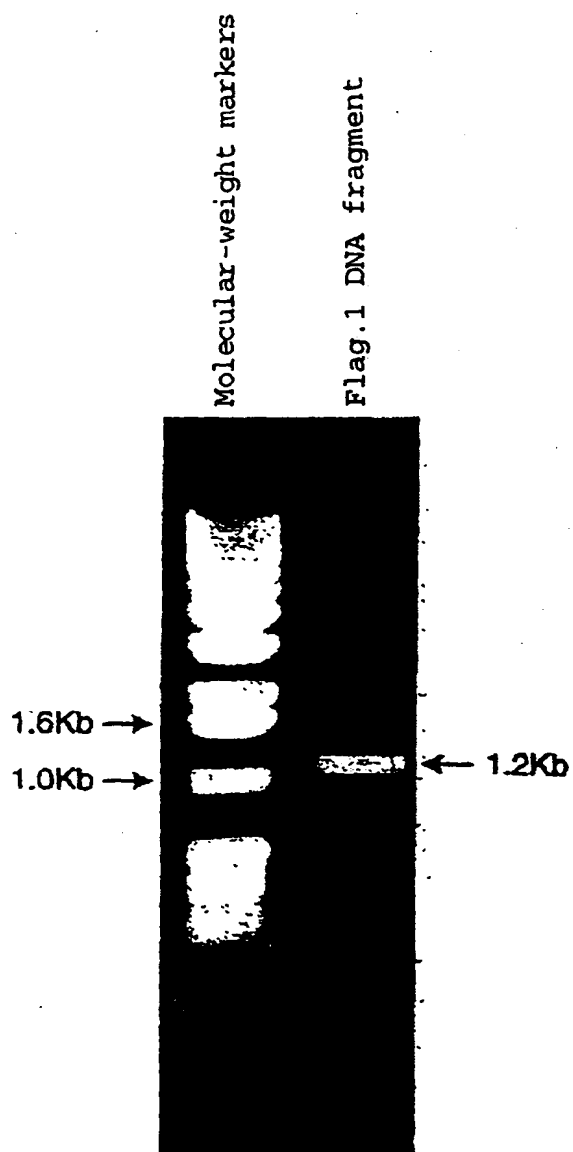




FIG. 3

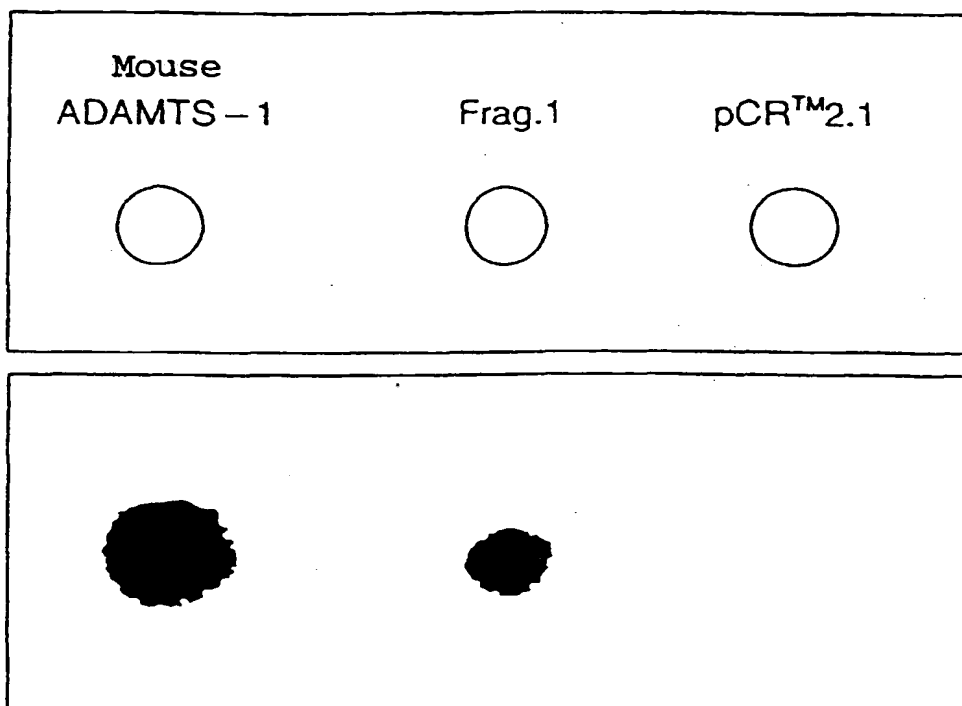
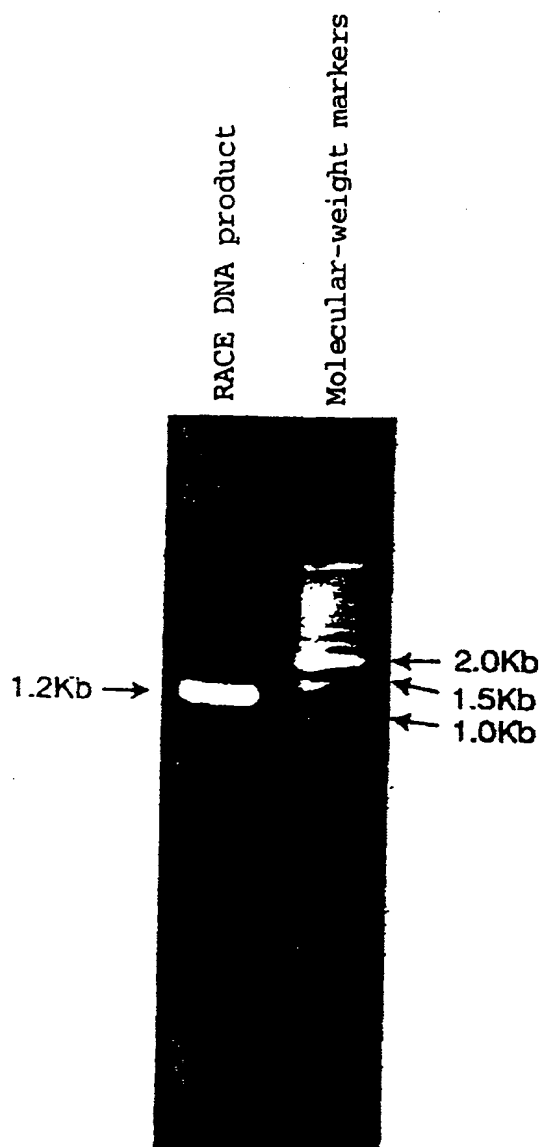




FIG. 4



## F I G. 5

Hu ADAMTS-1 1' ATGGATATCTGCAGAAATTCGGCTTAGGAAGAACGGAATTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
 \* \* \* \* \*  
 Mu ADAMTS-1 1" AAGCCATCAGGACCAGGAAGCATAAGGAAGAACGGAATTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
 \* \* \* \* \*  
 61' GAAACCATGCTTGTGGCAGACCAGTCGATGGCAGAAATCCACGGCAGTGGTCTAAAGCAT  
 \* \* \* \* \*  
 61" GAAACCATGCTCGTAGCTGACCAGTCATGGCCGACTTCCACGGCAGCGGTCTAAAGCAT  
 \* \* \* \* \*  
 121' TACCTTCTCACGTTGTTTTCGGTGGCAGCCAGATTGTACAAACACCCCGCATTCGTAAT  
 \* \* \* \* \*  
 121" TACCTTCTAACCCCTGTTCTCGGTGGCAGCCAGGTTTACAAAGCATCCAGCATTAGGAAT  
 \* \* \* \* \*  
 181' TCAGTTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCAATCCACGATGAACAGAAAGGGCCGGAA  
 \* \* \* \* \*  
 181" TCAATTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTCAATACGAGGAGCAGAAAGGACCAGAA  
 \* \* \* \* \*  
 241' GTGACCTCCAATGCTGCCCTCACTCTCGGGAACCTTTGCAACTGGCAGAAAGCAGCAAAAC  
 \* \* \* \* \*  
 241" GTTACCTCCAATGCAGCTCTCACCCCTTCGGAAATTTCTGCAGCTGGCAGAAACACAAAC  
 \* \* \* \* \*  
 301' CCACCCAGTGACCCGGGATGCAGAGCACTATGACACAGCAATTCCTTTCACCCAGACAGGAC  
 \* \* \* \* \*  
 301" AGCCCCAGTGACCCGGGATCCAGAGCACTATGACACTGCAATTCCTTTCACCCAGACAGGAT  
 \* \* \* \* \*  
 361' TTGTGTGGGTCCCAGACATGTGATACTCTTGGGATGGCTGATGTTGGAACCTGTGTGAT  
 \* \* \* \* \*  
 361" TTATGTGGCTCCCACACAGTGTGACACTCTCGGAATGGCAGATGTTGGAACCGTATGTGAC  
 \* \* \* \* \*  
 421' CCGAGCAGAAAGCTGCTCCGTCAATAGAAGATGATGGTTTACAAGCTGCCCTTCACCCAGGCC  
 \* \* \* \* \*  
 421" CCGAGCAGGAGCTGCTCAGTCATAGAAGATGATGGTTTIGCAAGCTGCCCTTCACCCAGGCC  
 \* \* \* \* \*

## F I G. 6

Hu ADAMTS-1 481' CATGAATTAGGCCACGTTGTTAACATGCCACATGATGATGCAAAAGCAGTGTGCCAGCCTT  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 481' CATGAATTGGGCCATGTTTAAACATGCCGCACGATGATGCTAAGCACTGTGCCAGCTTG  
\*\*\*\*\*  
541' AATGGTGTGAACCAAGGATTCACCACATGATGGCGTCAATGCTTCCAAACCTGGACCACAGC  
\*\*\*\*\*  
541" AATGGTGTGAGTGGCGATTCTCATCTGATGGCCTCGATGCTCTCCAGCTTAGACCATAGC  
\*\*\*\*\*  
601' CAGCCCTTGGTCTCCTTGCAGTGCCTACATGATTACATCATTTCTGGATAATGGTCAATGGG  
\*\*\*\*\*  
601" CAGCCCTGGTCAACCTTGCAGTGCCTACATGGTCAAGTCCCTTCCCTAGATAATGGACACGGG  
\*\*\*\*\*  
661' GAATGTTTGTGATGGACAAGCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCCAGGCGATCTCCCTGGCACCC  
\*\*\*\*\*  
661" GAATGTTTGTGATGGACAAGCCCAAGATCCAATCAAGCTCCCTTCTGATCTTCCCGGTACC  
\*\*\*\*\*  
721' TTGTACGATGCCAAACCGGCAGTGCCAGTTTACATTTGGGGAGGACTCCAAACACTGCCCCC  
\*\*\*\*\*  
721" TTGTACGATGCCAAACCGGCAGTGTCAGTTTACATTCGGAGAGGAATCCAAGCACTGCCCT  
\*\*\*\*\*  
781' GATGCAGCCAGCACATGTAGCACCTTGTGGTGTACCGGCACCTCTGGTGGGTGCTGGTG  
\*\*\*\*\*  
781" GATGCAGCCAGCACATGTACTACCTGTGGTGCACCTGGCACCTCCGGTGGCTTACTGGTG  
\*\*\*\*\*  
841' TGTCAAACCAACACTTCCCGTGGCGGATGGCACCAAGCTGTGGAGAGGAAATGGTGT  
\*\*\*\*\*  
841" TGCCAAACAAACACTTCCCTTGGGCAGATGGCACCAAGCTGTGGAGAGGAAATGGTGT  
\*\*\*\*\*  
901' ATCAACGGCAAGTGTGTGAACAAACCGACAGGAAGCATTTTGATACGCCCTTTTCATGGA  
\*\*\*\*\*  
901" GTCAGTGGCAAGTGGTGAACAAACAGACAGACATGAAGCATTTTGCTACTCCTGTTCATGGA  
\*\*\*\*\*

FIG. 7

Hu ADAMTS-1 961' AGCTGGGGACCATGGGGACCGTGGGGAGACTGTTGAGAAACGTGCGGTGGAGGAGTCCAG  
\*\*\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 961" AGCTGGGGACCATGGGGACCGTGGGGAGACTGCTCAAGAACCTGTGGTGGAGTTCAA  
\*\*\*\*\*  
1021' TACACGATGAGGGAATGTGACAACCCAGTCCCAAAGAAATGGAGGGAAGTACTGTGAAGGC  
\*\*\*\*\*  
1021" TACACAATGAGAGAAATGTGACAACCCAGTCCCAAAGAACGGAGGAAGTACTGTGAAGGC  
\*\*\*\*\*  
1081' AAACGAGTGGGCTACAGATCCTGTAACTTGAGGACTGTCCAGACAAATAATGGAAAAACC  
\*\*\*\*\*  
1081" AAACGAGTCCGCTACAGGTCCTGTAACTCGAGGACTGTCCAGACAAATAACGGAAAAACG  
\*\*\*\*\*  
1141' TT TAGAGAGGAACAAATGTGAAGCACACACGAGTTTCAAAAGCTTCCTTTGGGAGTGGG  
\*\*\*\*\*  
1141" TT CAGAGAGGAGCAGTGGGAGGCGCACAAATGAGTTTCCAAAGCTTCCTTTGGGAATGAG  
\*\*\*\*\*  
1201' CCTGCGGTGGAATGGATTCCCAAGTACGCTGGCGTCTCACCAAAGGACAGGTGCAAGCTC  
\*\*\*\*\*  
1201" CC CACTGTAGAGTGGACACCCCAAGTACGCCGGCGTCTGCCAAAGGACAGGTGCAAGCTC  
\*\*\*\*\*  
1261' ATCTGCCAAGCCAAAGGCAATGGCTACTTCTTCGTTTTCAGGCCCAAGGTTGTGATGGT  
\*\*\*\*\*  
1261" ACCTGTGAAGCCAAAGGCAATGGCTACTTTCGTCCTTACAGCCCAAGGTTGTAGATGGC  
\*\*\*\*\*  
1321' ACTCCATGTAGCCCCAGATTCCACCCTCTGCTGTGTGCAAGGACAGTGTGTAAAGCTGGT  
\*\*\*\*\*  
1321" ACTCCCTGTAGTCCAGACTCTACCTCTGCTGTGTGCAAGGCGCAGTGTGTGAAAGCTGGC  
\*\*\*\*\*  
1381' TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAATGTGGTGTTCGCGGGGAAAT  
\*\*\*\*\*  
1381" TGTGATCGCATCATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAGTGTGGCGTTTGTGGAGGAAAC  
\*\*\*\*\*

## FIG. 8

Hu ADAMTS-1 1441' GGATCTACTTGTAAAAAAATATCAGGATCAGTTACTAGTGCAAAACCTGGATATCATGAT  
\*\*  
Mu ADAMTS-1 1441" GGTTCCACATGCAAGAAAGATGTCAGGAATAGTCACTAGTACAAGACCTGGGTATCATGAC  
1501' ATCGTCACAAATCCAACTGGAGCCACCAACATCGAAGTGAACAGCGGAACCCAGAGGGGA  
\*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\*  
1501" ATGTCAACAATTCCTGCTGGAGCCACCAACATCGAAGTGAACATCGGAATCAAAAGGGGG  
1561' TCCAGGAACAATGGCAGCTTCTTGCCATCAAAAGCTGCTGATGGCACATATATCTTAAT  
\*\* \*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1561" TCCAGAAACAATGGCAGCTTCTGGCTATTAGAGCCGCTGATGGTACCTATATCTGAAT  
1621' GG TGACTACACTTGTCCACCTTAGAGCAAGACATTATGTACAAAGGTGTGCTTGAGG  
\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1621" GGAAACTTCACCTCTGTCCACACTAGAGCAAGACCTCACCTACAAAGGTACTGTCTTAAGG  
1681' TACAGCGGCTCCTCTGCGGCATTGGAAAGAAATTCGCAGCTTAGCCCTCTCAAAGAGCCCC  
\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1681" TACAGTGGTTCCTCGGCTGCGCTGGAAAGAAATCCGCAGCTTAGTCCACTCAAAGAACCCC  
1741' TTGACCATCCAGGTTCTTACTGTGGGCAATGCCCTTCGACCTAAAATTAATACACCTAC  
\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1741" TTAACCATCCAGGTTCTTATGGTAGGCCATGCTCTCCGACCCAAATTAATTCACCTAC  
1801' TT CGTAAAGAAGAAGGAATCTTTCAATGCTATCCCCACTTTTTCAGCATGGGTCAAT  
\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1801" TTATGAAGAAGAAGACAGAGTCATTCAACGCCATTCCACATTTTCTGAGTGGGTGATT  
1861' GAAGAGTGGGGCGAATGTTCTAAGTCATGTGAATGGGTTGGCAGAGAAGACTGGTAGAA  
\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\* \*\*~\*\* \*\*  
1861" GAAGAGTGGGGGAGTGCTCCAAGACATGCGGCTCAGGTTGGCAGAGAAGAGTAGTGCAG

## F I G. 9

Hu ADAMTS-1 1921' TGCCGAGACATTAATGGACAGCCTGCTTCCGAGTGTGCAAGGAAGTGAAGCCAGCCAGC  
\*\*\*  
Mu ADAMTS-1 1921" TGCAGAGACATTAACGGACACCCCTGCTTCCGAATGTGCAAGGAAGTGAAGCCAGCCAGT  
1981' ACCAGACCTTGTGCAGACCATCCCTGCCCCCCAGTGGCAGCTGGGGGAGTGGTCAATCATGT  
1981" ACCAGACCTTGTGCAGACCTTCCTTGCCCCACACTGGCAGGTGGGGGATTTGGTCAACCATGT  
2041' TCTAAGACCTGTGGGAAGGGTTACAAAAAAGAAAGCTTGAAAGTGTCTGTCCCATGATGGA  
2041" TCCAAACTTGCAGGAGGGTTACAAAGAGAGAACCTTGAAATGTGTGTCCACGATGGG  
2101' GGGGTGTTATCTCATGAGAGCTGTGATCCTTTAAAGAAACCTAAACATTTCAATAGACTTT  
2101" GGCTGTTATCAATGAGAGCTGTGATCCTTTGAAGAAAGCCAAAGCATTACATTTGACTTT  
2161' TGCACACTGACACAGTGCAGTTAA  
2161" TGCACACTGACACAGTGCAGTTAA

## FIG. 10

```

      |-----MMP domain
Hu ADAMTS-1  1'  MDICRIRLRKKR|RFVSSPRYVETMLVADQSM
                *****
Mu ADAMTS-1  1"  EPSGPGSIRKKR|RFVSSPRYVETMLVADQSM

31'  AEFHGSGGLKHYYLLTLFSVAARLYKHPSIRN
    * *****
31"  ADFHGSGGLKHYYLLTLFSVAARFYKHPSIRN

61'  SVSLVVVKILVIHDEQKGPEVTSNAALTLR
    * *****
61"  SISLVVVVKILVIYEEQKGPEVTSNAALTLR

91'  NFCNWQKQHNPPSDRDAEHYDTAILFTRQD
    *** *****
91"  NFCSWQKQHNSPSDRDPEHYDTAILFTRQD

121'  LCGSQTCDTLGMADVGTVCDPSPRSCSVIED
    **** *****
121"  LCGSHTCDTLGMADVGTVCDPSPRSCSVIED
      (zinc binding

      site]
151'  DGLQAAFTTAHELGHVFNMPHDDAKQCASL
    *****
151"  DGLQAAFTTAHELGHVFNMPHDDAKHCASL

181'  NGVNQDSHMMASMLSNLDHSQPWSPCSAYM
    *** *****
181"  NGVSGDSHLMASMLSSLDHSQPWSPCSAYM

211'  ITSFLDNGHGGECLMDKPQNPIQLPGDLPGT
    *****
211"  VTSFLDNGHGGECLMDKPQNPIKLP|SDLPGT
      |-----DI domain

```

## FIG. 11

```

Hu ADAMTS-1 241' LYDANRQCQFTFGEDSKHCPDAASTCSTLW
                *****
Mu ADAMTS-1 241" LYDANRQCQFTFGEE SKHCPDAASTCTTLW

271' CTGTSGGVLVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC
    *****
271" CTGTSGGLLVCQTKHFPWADGTSCGEGKWC

                                TSP domain
301' INGKCVNKTD RKHFDTPFHGS WGPWGPWGD
    *****
301" VSGKCVNKTD MKHFATPVHGS WGPWGPWGD

331' CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG
    *****
331" CSRTC GGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG

361' KRVRYRSCNLED CPDNNGKTFREEQCEAHN
    *****
361" KRVRYRSCNIED CPDNNGKTFREEQCEAHN

391' EFSKASFGSGPAVEWIPKYAGVSPKDRCKL
    *****
391" EFSKASFGNEPTVEWTPKYAGVSPKDRCKL

421' ICQAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV
    *
421" TCEAKGIGYFFVLQPKVVDGTPCSPDSTSV

451' CVQGQC VKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN.
    *****
451" CVQGQC VKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN

481' GSTCKKISGSVTS AKPGYHDIVTIPTGATN
    *****
481" GSTCKKMSGIVTSTRPGYHDIVTIPAGATN

```



## FIG. 12

```

Hu ADAMTS-1 511' IEVKQRNQRGSRNNGSFLAIKAADGTYILN
          *****
Mu ADAMTS-1 511" IEVKHRNQRGSRNNGSFLAIRAADGTYILN

541' GDYTLSTLEQDIMYKGVVLRYSGSSAALER
    * *****
541" GNFTLSTLEQDLTYKGTVLRYSGSSAALER

571' IRSFSPLKEPLTIQVLTVGNALRPKIKYTY
    *****
571" IRSFSPLKEPLTIQVLMVGHALRPKIKFTY

                                TSP domain
601' FVKKKKESFNAIPTFSAWVIEEWGECSKSC
    * *** *****
601" FMKKKTESFNAIPTFSEWVIEEWGECSKTC

631' ELGWQRRRLVECRDINGQPASECAKEVKPAS
    *****
631" GSGWQRRRVVQCRDINGHPASECAKEVKPAS

                                TSP domain
661' TRPCADHPCPQWQLGEWSSCSKTCGKGYYK
    *****
661" TRPCADLPCPHWQVGDWSPCSKTCGKGYYK

691' RSLKCLSHDGGVLSHESCDPLKKPKHFIDF
    * ***
691" RTLKCVSHDGGVLSNESCDPLKKPKHYIDF

721' CTLTQCS
    *****
721" CTLTQCS

```

FIG. 13

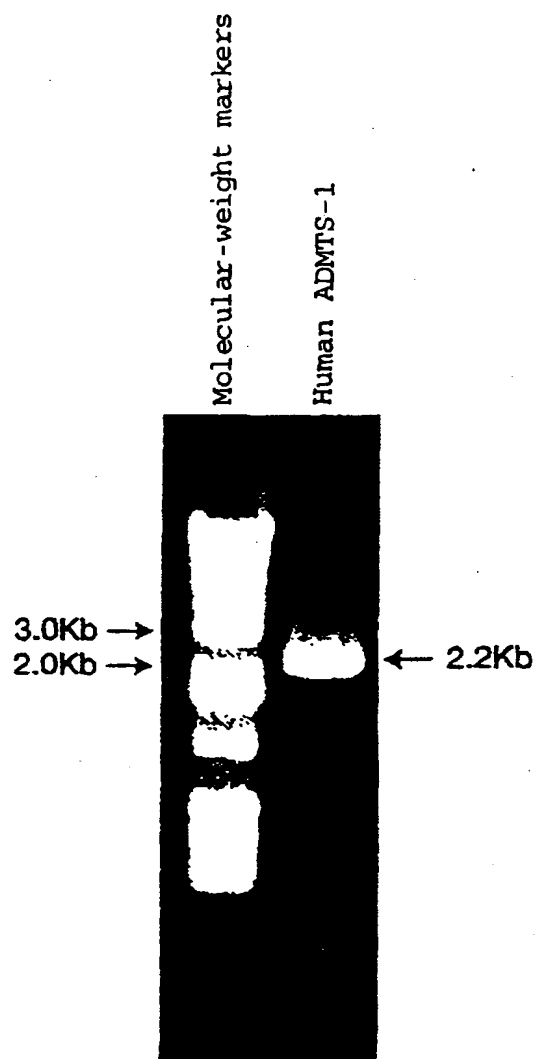


FIG. 14

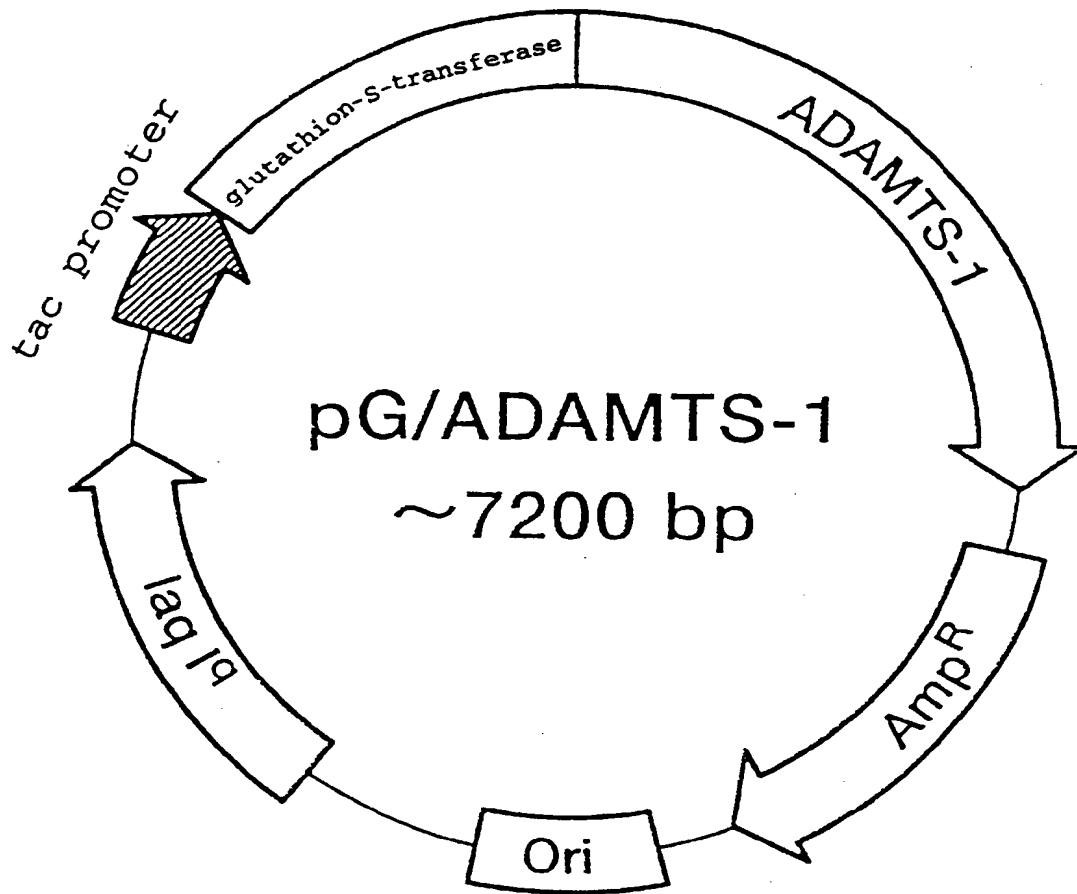


FIG. 15

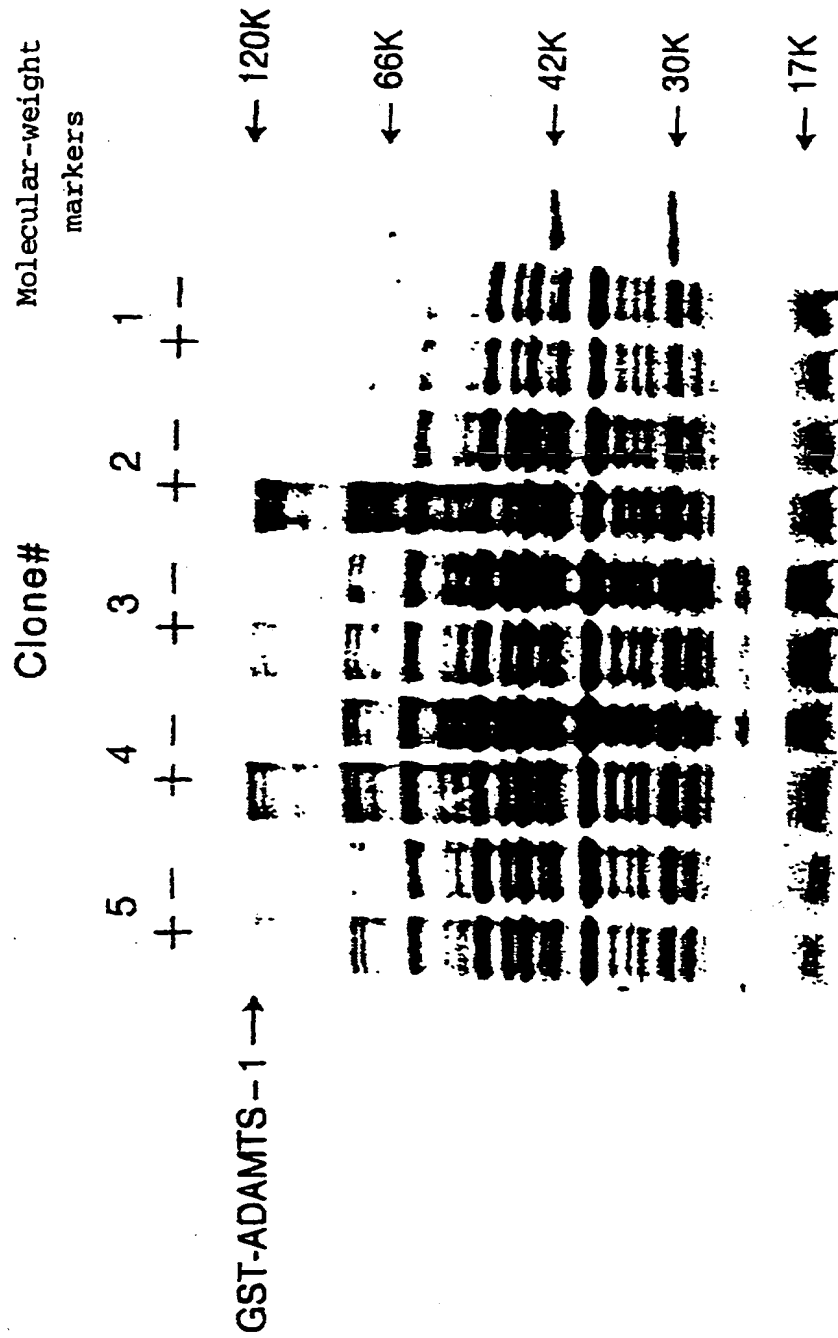


FIG. 16

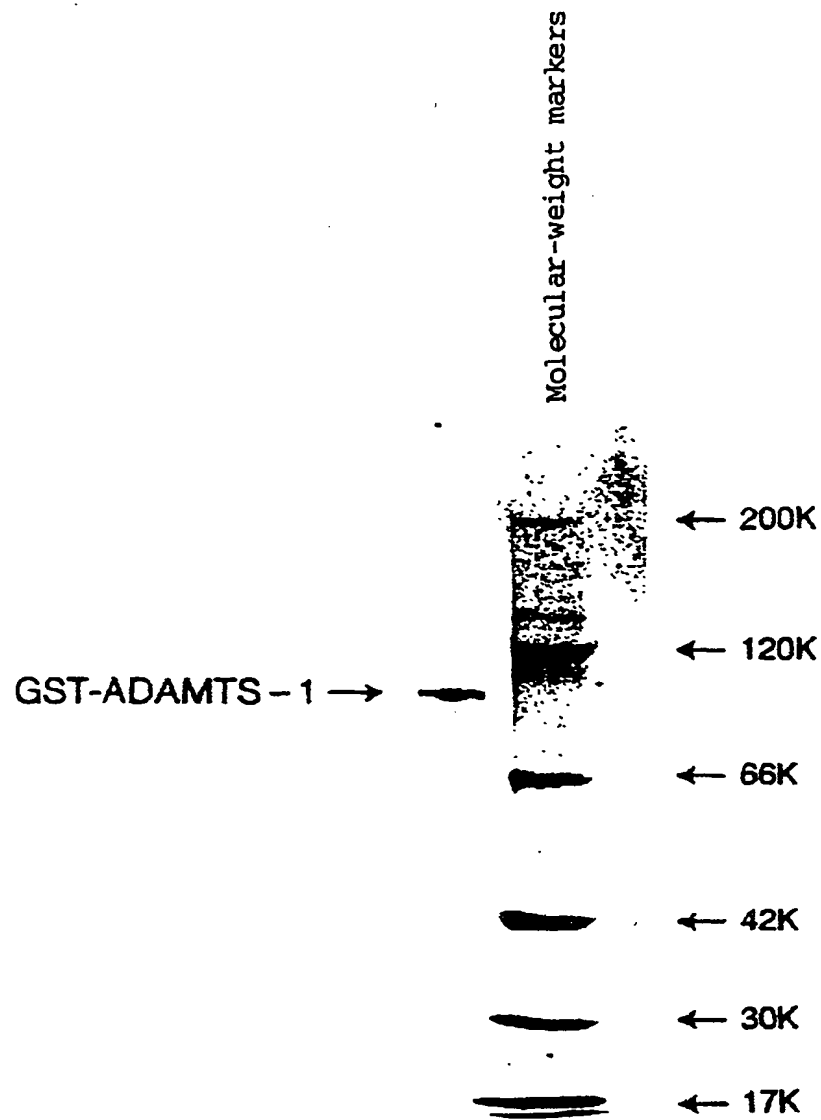
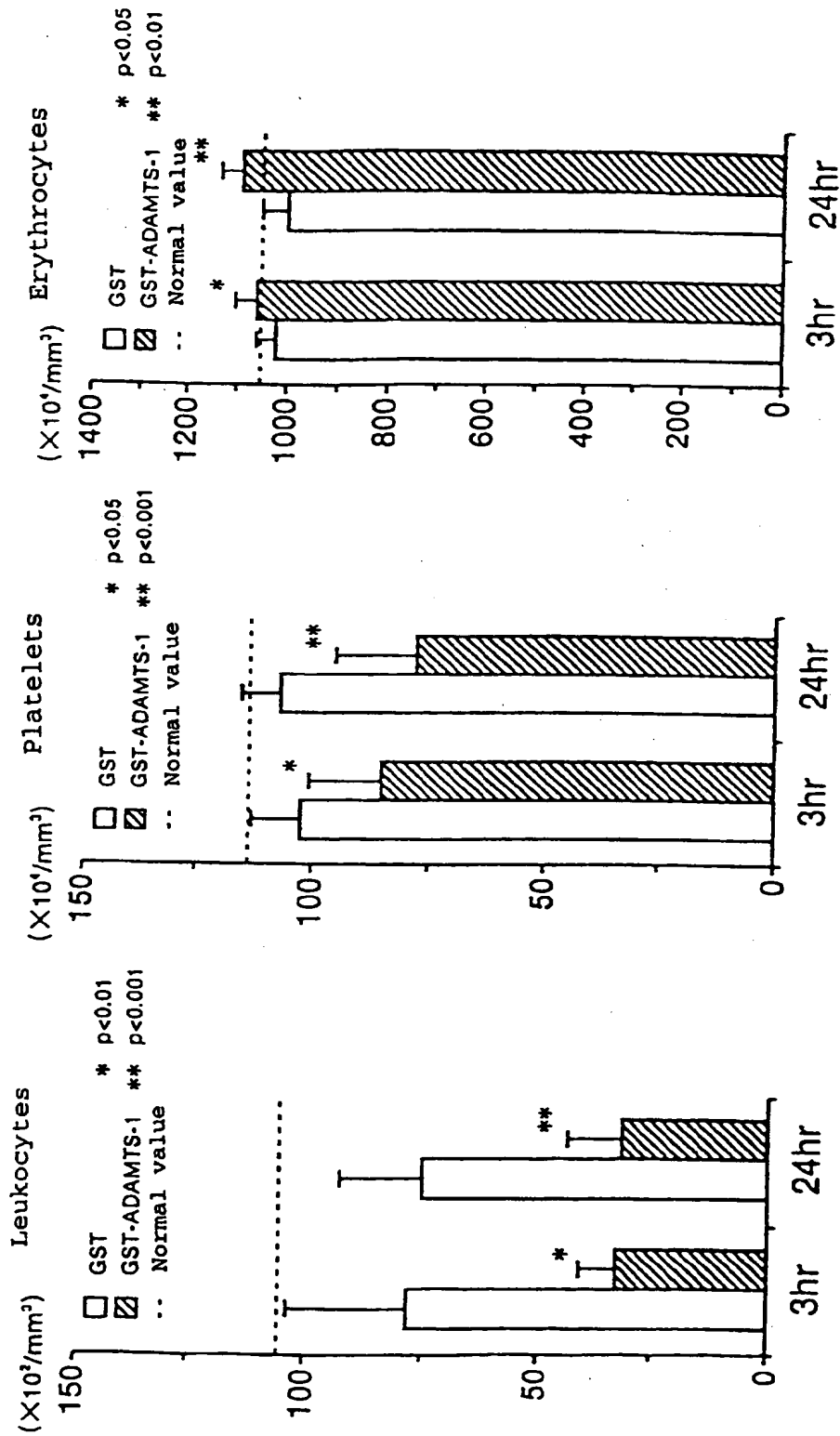


FIG. 17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02449

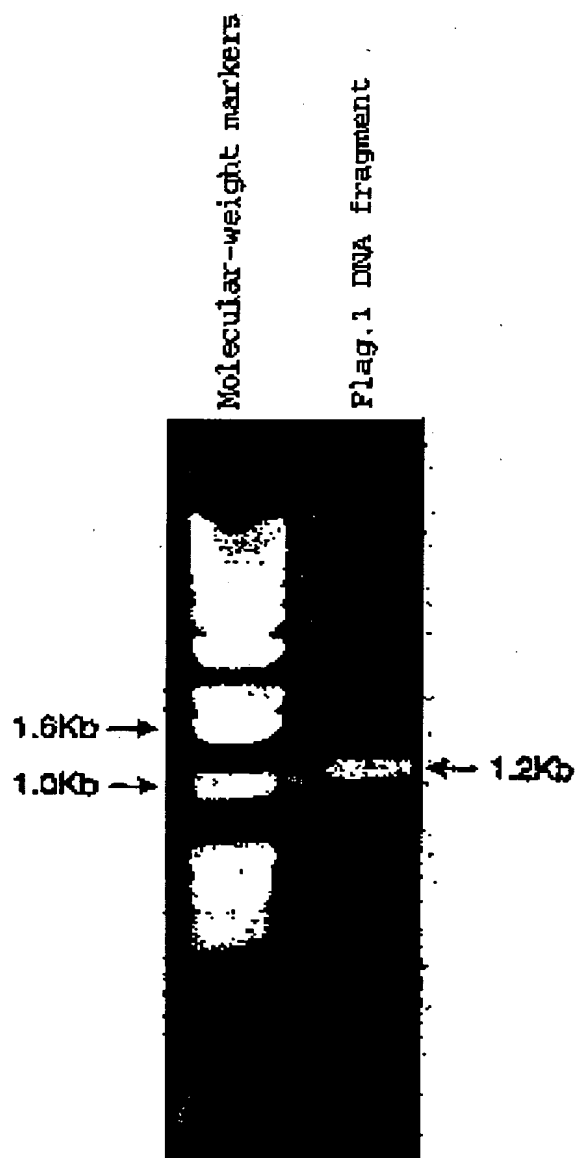
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305 // C07K14/745, C07K14/78, C07K16/18, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12P21/02, C12N15/12, C12N1/21, A61K38/43, A61K38/48, A61K38/16, G01N33/53, A23L1/305 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	The Journal of Biological Chemistry. Vol. 272 No. 1 (1997) Kouji Kuno et al., "Molecular Cloning of Gene Encoding a New Type of Metalloproteinase-disintegrin Family Protein with Thrombospondin Motifs as an Inflammation Associated Gene" p.556-562	1-20, 24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "U" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 September, 1998 (04. 09. 98)		Date of mailing of the international search report 16 September, 1998 (16. 09. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



FIG. 1



**FIG. 2**

BNSDOCID: <EP\_\_1004674A1TI >

FIG. 3

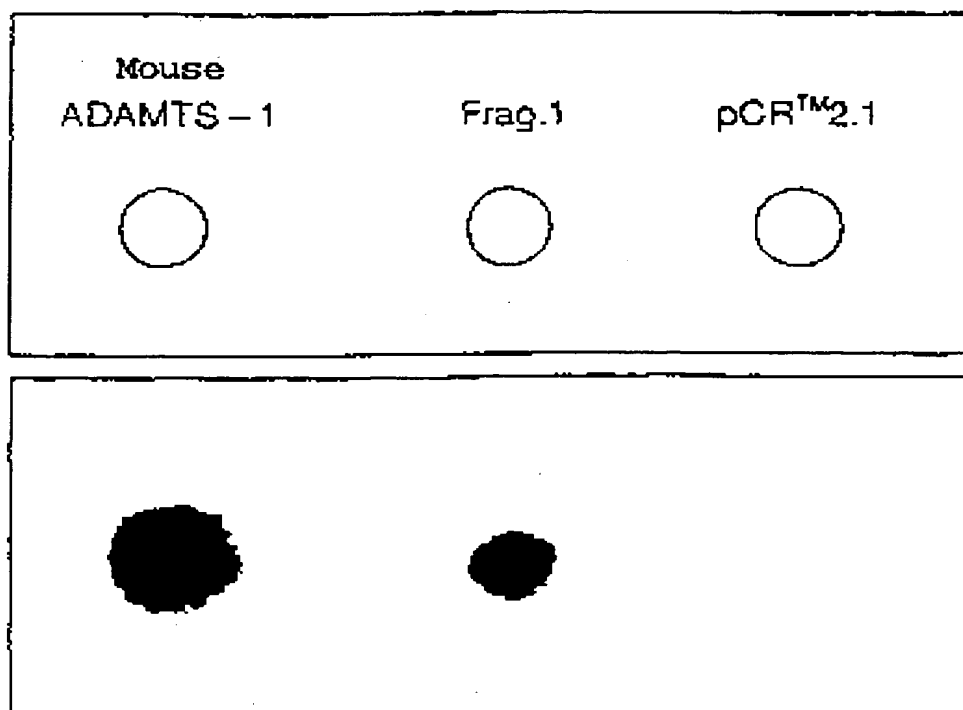
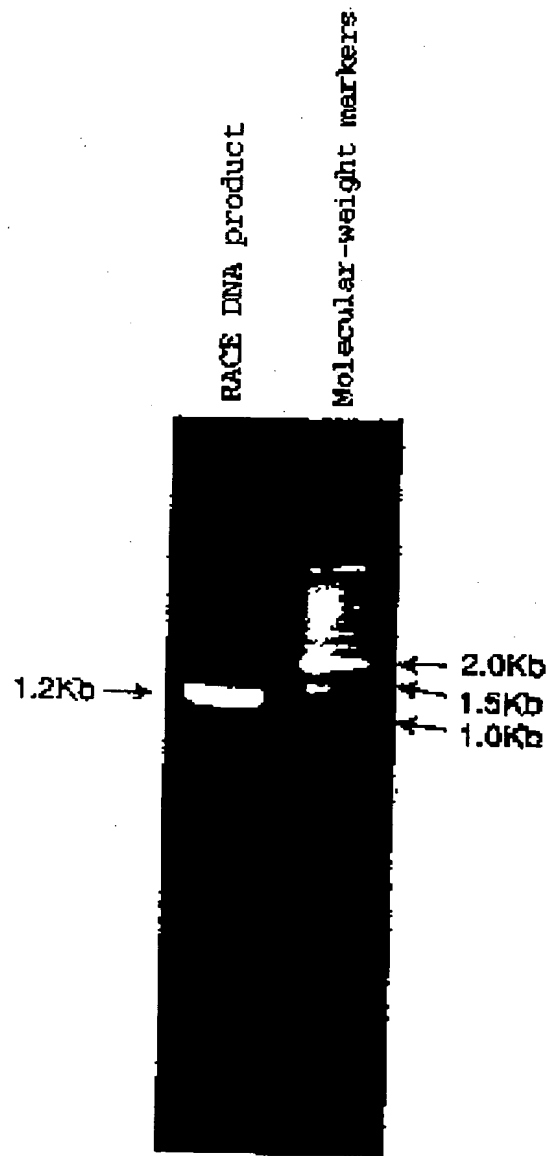


FIG. 4



## FIG. 5

Hu ADAMTS-1 1' ATGGATATCTGCAGAAATTCGGCTTAGGAAGAAAGCCGATTTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
 \* \* \* \* \*  
 Mu ADAMTS-1 1" AAGCCATCAGGACCAGGAAGCATAAGGAAGAAAGCCGATTTGTGTCCAGCCCCCGTTATGTG  
 \* \* \* \* \*  
 61' GAAACCATGCTTGTGGCAGACCAAGTCGATGCGAGAAATCCACGGCAGTGGTCTAAAGCAT  
 \*\* \*\* \*\* \*\*  
 61" GAAACCATGCTGCTAGCTGACCAAGTCATGCGCGACATCCACGGCAGCGGTCTAAAGCAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 121' TACCTTCTCAAGTTCGTTTCGGTGGCAGCCAGATTTGTACAAACACCCCGCATTTGGTAAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 121" TACCTTCTAAACCGCTGTTCTCGGTGGCAGCCAGGTTTACAAAGCATCCAGCATTAGGAAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 181' TCAGTTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGYCATCCACGATGAACAGAGAGGGCCGGAA  
 \*\* \*\* \*\*  
 181" TCAGTTAGCCCTGGTGGTGAAGATCTTGGTATATACGAGGAGCAGAGGGAGCCAGAA  
 \*\* \*\* \*\*  
 241' GTGACCTCCAAATGCTGCCCTCACTCTGCGGAATTTTGCAACTGGCAGAGCAGCCACAC  
 \*\* \*\* \*\*  
 241" GTTACCTCCAAATGCAGCTCTCACCCCTTCGGAAATTTCTGCAGCTGGCAGAAACACACAA  
 \*\* \*\* \*\*  
 301' CCACCCAGTGACCCGGGATGCAGAGGACATATGACACAGCAATTCCTTTCACCCAGACAGGAC  
 \*\* \*\* \*\*  
 301" AGCCCCAGTGACCCGGGATCCAGAGGACATATGACACTGCAATTCCTTTCACCCAGACAGGAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 361' TTGTGTGGTCCAGACAIGTGATACTCTTGGGATGGCTGATGTGGAACTGTGTGTGAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 361" TTATGTGGTCCACACACCTGTCACACATCTCGGAATGGCAGATGTGGAACTGTGTGTGAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 421' CCGAGCAGAAAGCTGCTCCGTCTATAGAAAGATGATGGTTTACAAAGCTGCCCTTCACCAACAGCC  
 \*\* \*\* \*\*  
 421" CCGAGCAGAAAGCTGCTCAGTCTATAGAAAGATGATGGTTTTCAGAGCTGCCCTTCACCAACAGCC  
 \*\* \*\* \*\*

## FIG. 6

Mu ADAMTS-1 481' CATGAATTAGGCCACGGTGYTTAACAAYGCCACATGATGATGCAAAAGCAGTGTGCCACGCCCT  
 \*\*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-1 481' CATGAATTGGGCCCATGTGTTTAAACATGCCGACGATGATGCTAAGCACTGTGCCAGCTTG  
 \*\*\*\*\*  
 541' AATGGTGTGAACCCAGGATTCACACATGATGGCGTCAATGCTTCCAAACCTGGACCAACAGC  
 \*\*\*\*\*  
 541' AATGGTGTGAGTGGCGATTCCTCATCTGATGGCTCGAATGCTCTCCAGCTTAGACCAIAGC  
 \*\*\*\*\*  
 541' CAGCCTTGGTCTCCTTGCAAGTGCCCTACATGATTACATCATTTCTGGGATAATSGTCAIAGG  
 \*\*\*\*\*  
 561' CAGGCCCTGGTGCACCTTGCAAGTGCCCTACATGATTACATCATTTCTGGGATAATSGTCAIAGG  
 \*\*\*\*\*  
 561' GAATGTYTTGATGGACAAAGCCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCGAGGCGATCTCCCTGGCAAC  
 \*\*\*\*\*  
 561' GAATGTYTTGATGGACAAAGCCCTCAGAAATCCCATACAGCTCCGAGGCGATCTCCCTGGCAAC  
 \*\*\*\*\*  
 721' TTGTACGATGCCAAACCGGCGAGTGCCAGTTTACATTTGGGGAGGACTCCAAACACTGCCCC  
 \*\*\*\*\*  
 721' TTGTACGATGCCAAACCGGCGAGTGCCAGTTTACATTTGGGGAGGACTCCAAACACTGCCCC  
 \*\*\*\*\*  
 781' GATGCAGCCAGCACATGTAGCACCTTGTGGTGTACCGGCACCTCTGTGTGGGTGCTGTG  
 \*\*\*\*\*  
 781' GATGCAGCCAGCACATGTAGCACCTTGTGGTGTACCGGCACCTCTGTGTGGGTGCTGTG  
 \*\*\*\*\*  
 841' TGTCAAACCAACACTTCCCGTGGCGGATGGCACCGCTGTGGAGAGGGAATGGTGT  
 \*\*\*\*\*  
 841' TGCCAAACCAACACTTCCCGTGGCGGATGGCACCGCTGTGGAGAGGGAATGGTGT  
 \*\*\*\*\*  
 901' ATCAACGGCAAGTGTGTGAACAAACCGACAGGAAGCAATTTGATACGCCCTTTTCAIAGGA  
 \*\*\*\*\*  
 901' GTCAGTGGCAAGTGTGTGAACAAACCGACAGGAAGCAATTTGATACGCCCTTTTCAIAGGA  
 \*\*\*\*\*

FIG. 7

Mu ADAMTS-1 561' AGCTGGGGACCAATGGGGACCGTGGGGAGAGTGTTCGAGAAACGTGCGGTGGAGGAGTCCAG  
 \*\*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-1 561" AGCTGGGGACCAATGGGGACCGTGGGGAGAGTGTTCGAGAAACCTGTGTTGGTGGAGTTCAA  
 \*\*\*\*\*  
 1021' TACACGATGAGGGGAATGTGACAACCCAGTCCCAAGAAATGGAGGGAAGTACTGTGAAGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1021" TACACAAATGAGAGAAATGTGACAACCCAGTCCCAAGAAACGGAGGGAAGTACTGTGAAGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1081' AAACGAGTGGGCTACAGATCCTGTAACTTGAGGACTGTCCAGACAATAATGGAAAAACC  
 \*\*\*\*\*  
 1081" AAACGAGTGGGCTACAGATCCTGTAACTTGAGGACTGTCCAGACAATAACGGAAAAACC  
 \*\*\*\*\*  
 1141' TTATGAGAGGAACAATGTGAAGCACACAAACGAGTYYCAAAAGCTTCCTTTGGGAGTGGG  
 \*\*\*\*\*  
 1141" TTCAGAGAGGAGCAGTGCAGGGGACAAATBAGTTTTCCAAAGCTTCCTTTGGGAAATGAG  
 \*\*\*\*\*  
 1201' CCTGCGGTGGAATGGGATTCGCAAGTACGCTGGCGTCTLACCAAAGGACACAGTGCAGGCTC  
 \*\*\*\*\*  
 1201" CCGACTGTAGABTGGACACCCCAAGTACGCCCGCGTCTCGCCAAAGGACAGGTGCAGGCTC  
 \*\*\*\*\*  
 1261' ATCTGCCAAGCCAAAGGCATTGGCTACTTCTTCGTTTTGCGAGCCCAAGCTTGTGATGGT  
 \*\*\*\*\*  
 1261" ACCGTGGAAGCCAAAGGCATYGGCTACTTTTCTGCTTACAGGCCCAAGGTTGTAGATGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1321' ACTCCATGTAGCCCCAGATTCACACCTCTGTCTGTGTGCAAGGACAGTGTGTAAAGCTGGT  
 \*\*\*\*\*  
 1321" ACTCCCTGTAGTCCAGACTCTACCTCTGTCTGTGTGCAAGGCGAGTGTGTAAAGCTGGC  
 \*\*\*\*\*  
 1381' TGTGATCGCATATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAATGTGGTGTTCGCGGGGAAAT  
 \*\*\*\*\*  
 1381" TGTGATCGCATATAGACTCCAAAAAGAAAGTTTGATAAAGTGTGGCGTTTGTGAGBGAAC

## F I G. 8

Hu ADAMTS-1 1441' GGATCTACTTGTAAAAAATAATCAGGATCAGTTACTAGTGC AAAAACCCTGGATATCATGAT  
 \*\*  
 Mo ADAMTS-1 1441' GGTTCCACATGCAAGAGATGTCAGGAATAGTCACATAGTACAAAGACCTGGGTATCATGAC  
 \*\* \*\* \*\* \*\* \*\*  
 1501' ATCGTCACAAATTCCAAATCGAGCCACCACCAACATCGAAGTGAACACAGCGBAACACAGAGGGGA  
 \*\* \*\* \*\*  
 1501' ATGTCAACAATTCCTGCTGGAGCCACCACCAACATTTGAAGTGAACATCGBAATCAAAGGGGG  
 \*\* \*\* \*\*  
 1551' TCCAGGAACAATGGCAGCTTCTTGCCATCAAAGCTGCTGATGGCACATATATCTTAAT  
 \*\*\* \*\*  
 1561' TCCAGAAACAATGGCAGCTTCTGGCTATTAGAGCCGCTGATGGTACCTATATCTGAAT  
 \*\* \*\* \*\*  
 1621' GGTGACTACACTTGTGCCACTTAGAGCAAGACATATATGTACAAAGGTGTGTCTTGGAGG  
 \*\* \*\* \*\*  
 1621' GGAAACTTCAETCTGTCCACACTAGAGCAAGACCTCACCTACAAAGCTACTGTCTTAAGG  
 \*\* \*\* \*\*  
 1681' TACAGGGGGCTCTCTCGGOCATTGGAAGAAATTCGACGCTTTCGCCCTCTCAAAAGAGCCC  
 \*\*\* \*\*  
 1681' TACAGTGGTCTCTCGGCTGGGCTGGAAAGAAATCCGACGCTTTAGTCCACTCAAAGAACCC  
 \*\*\* \*\*  
 1741' YTGACCATCCAGGTCTTACTGTGGGCAATGCCCTTCGACCTAAATTAATACACCTAC  
 \*\* \*\* \*\*  
 1741' TTAACCATCCAGGTCTTATGGTAGGCCATGCTCTCGGACCCAAATTAATTCACCTAC  
 \*\* \*\* \*\*  
 1801' TYCGTAAAGAAAGGAATCTTCAATGCTATCCCCACTTTTTCAGCATGGGTCATT  
 \*\* \*\* \*\*  
 1801' TTTATGAAGAAAGACAGAGTCAATCAACGCCATTCCACATTTCTGAGTGGGTGATT  
 \*\* \*\* \*\*  
 1851' GAAGAGTGGGGCGAATGTCTAAGTCAATGTGAATGGGTTGGCAGAGAGACTGGTAGAA  
 \*\*\* \*\*  
 1851' GAAGAGTGGGGGAGTCTCCAAAGACATGGGGCTCAGGTTGGCAGAGAGAGTAGTGCAG



46

## FIG. 10

```

      |-----MMP domain
Hu ADAMTS-1  1'  MDICRIRLRKKRFVSSPRYVETMLVADQSM
                *****
Mu ADAMTS-1  1"  EPSGPGSIRKKRFVSSPRYVETMLVADQSM

31'  AEFHGSGLKHYLLTLFSVAARLYKHPSIRN
    * *****
31"  ADFHGSGLKHYLLTLFSVAARFYKHPSIRN

61'  SVSLVVVKILVIHDEQKGPEVTSNAALTLR
    * *****
61"  SLSLVVVKILVIYEEQKGPEVTSNAALTLR

91'  NFCNWQKQKHNPPSDRDAEHYDTAILFTRQD
    *** *****
91"  NFCSWQKQKHNPPSDRDPERHYDTAILFTRQD

121'  LCGSQTCDTLGMADVGTVCDPSSRSCSVIED
    **** *****
121"  LCGSKTCDTLGMADVGTVCDPSSRSCSVIED
      [zinc binding
      site)
151'  DGLQAAFTTAHELGHVFENMPHODAKQCASL
    *****
151"  DGLQAAFTTAHELGHVFENMPHODAKHCASL

181'  NGVNQDSHMMASMLSLNLDHSQPWSPCSAYM
    *** *****
181"  NGVSGDSHLMASMLSSLNLDHSQPWSPCSAYM

211'  ITSFLDNGHGCECLMDKPQNP1QLP|GDLPQT
    *****
211"  VTSFLDNGHGCECLMDKPQNP1KLP|SDLPQT
      |-----DI domain

```

## FIG. 11

HU ADAMTS-1 241' LYDANRQCQFTFGEDSKHCPDAASTCSTLW  
 \*\*\*\*\*  
 MU ADAMTS-1 241' LYDANRQCQFTFGDEESKHCPDAASTCTTLW  
 271' CTGTSGGVLVCQTKHF PWADGTSCGEGKWC  
 \*\*\*\*\*  
 271" CTGTSGGGLVCQTKHF PWADGTSCGEGKWC  
 TSP domain  
 301' INQKCVNXTRDKHFDTPFHGS WGFPWGFPWGD  
 \*\*\*\*\*  
 301" VSGKCVNKTDMKHFATPVHGS WGFPWGFPWGD  
 331' CSRTCGGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG  
 \*\*\*\*\*  
 331" CSRTCGGGVQYTMRECDNPVPKNGGKYCEG  
 361' KRVRYRSCNLEDC CPDNNGKTFREEQCEAHN  
 \*\*\*\*\*  
 361" KRVRYRSCNIED CPDNNGKTFREEQCEAHN  
 391' EFSKASFGSGPAVEWIPKYAGVSPKDRCKL  
 \*\*\*\*\*  
 391" EFSKASFGNEPTVWEWTPKYAGVSPKDRCKL  
 421' ICQAKGIGYFFVLQPKVVVGTPCSPDSTSV  
 \* \*\*\*\*\*  
 421" TCEAKGIGYFFVLQPKVVVGTPCSPDSTSV  
 451' CVQGQCCKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN,  
 \*\*\*\*\*  
 451" CVQGQCCKAGCDRIIDSKKKFDKCGVCGGN  
 481' GSTCKKISGSVTSAPGYHDIVTIPTGATN  
 \*\*\*\*\*  
 481" GSTCKKMSGIVTSTRPGYHDIVTIPAGATN

## FIG. 12

Hu ADAMTS-2 511' IEVKQRNQRCGRNNGSFLAIKAADGTYILN  
 \*\*\*\*\*  
 Mu ADAMTS-1 511' IEVKHRNQRCGRNNGSFLAIRAADGTYILN

541' GDYTLSTLEQDIMYKGVVLRYSOSSAALER  
 \* \*\*\*\*\*  
 541" GNFTLSTLEQDLTYKGTVLRYSOSSAALER

571' IRSFSPLKEPLTIQVLTVGNALRPKIKYTY  
 \*\*\*\*\*  
 571" IRSFSPLKEPLTIQVLMVGHALRPKIKFTY

TSP domain  
 601' FVKKXKESFNAIPTFSAWVIEEWGECSKSC  
 \* \* \* \* \*  
 601" FMKKKTESFNAIPTFSEWVIEEWGECSKTC

631' ELGWQRRRLVECRDINGQPASECAKEVKPAS  
 \* \* \* \* \*  
 631" GSGWQRRRVVQCRDINGHPASECAKEVKPAS

TSP domain  
 661' TRPCADHPCPQWQLCEWSSCSKTGKGYKK  
 \* \* \* \* \*  
 661" TRPCADLPCHWQVGDWSPCSXTGKGYKK

691' RSLKCLSHDGGVLSHESCOPLKKPKHFIDF  
 \* \* \* \* \*  
 691" RTLKCVSHDGGVLSNESCOPLKKPKHYIDF

721' CTLTQCS  
 \* \* \* \* \*  
 721" CTLTQCS

FIG. 13

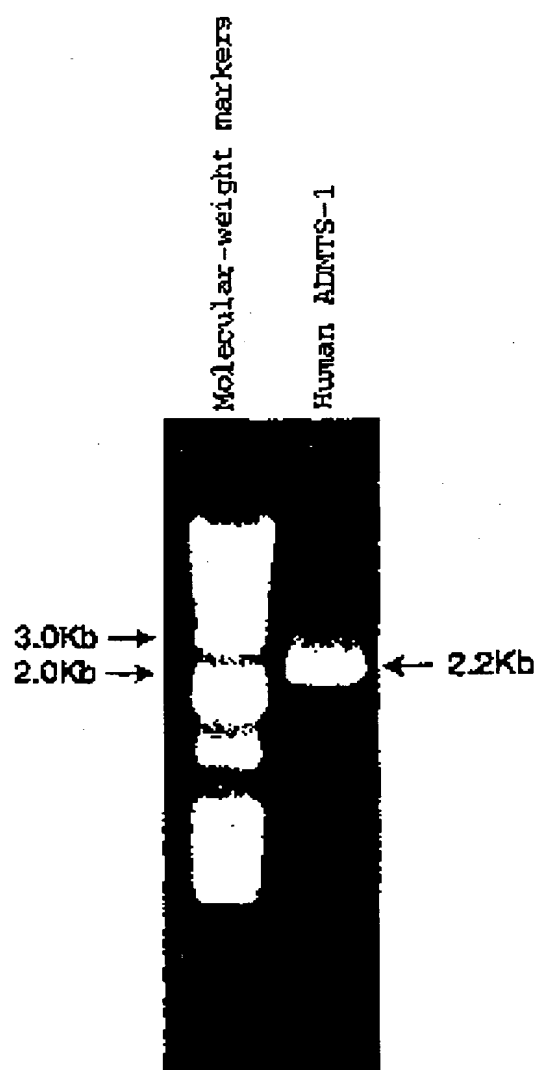


FIG. 14

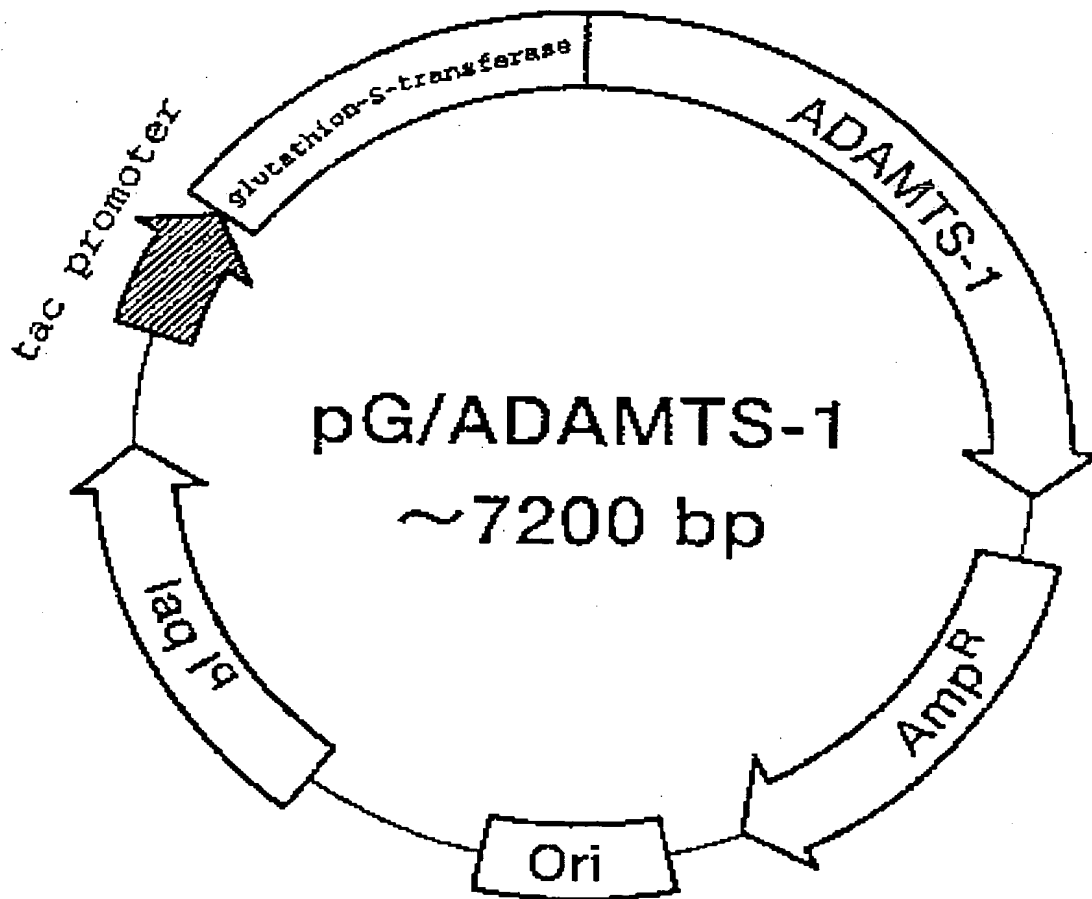


FIG. 15

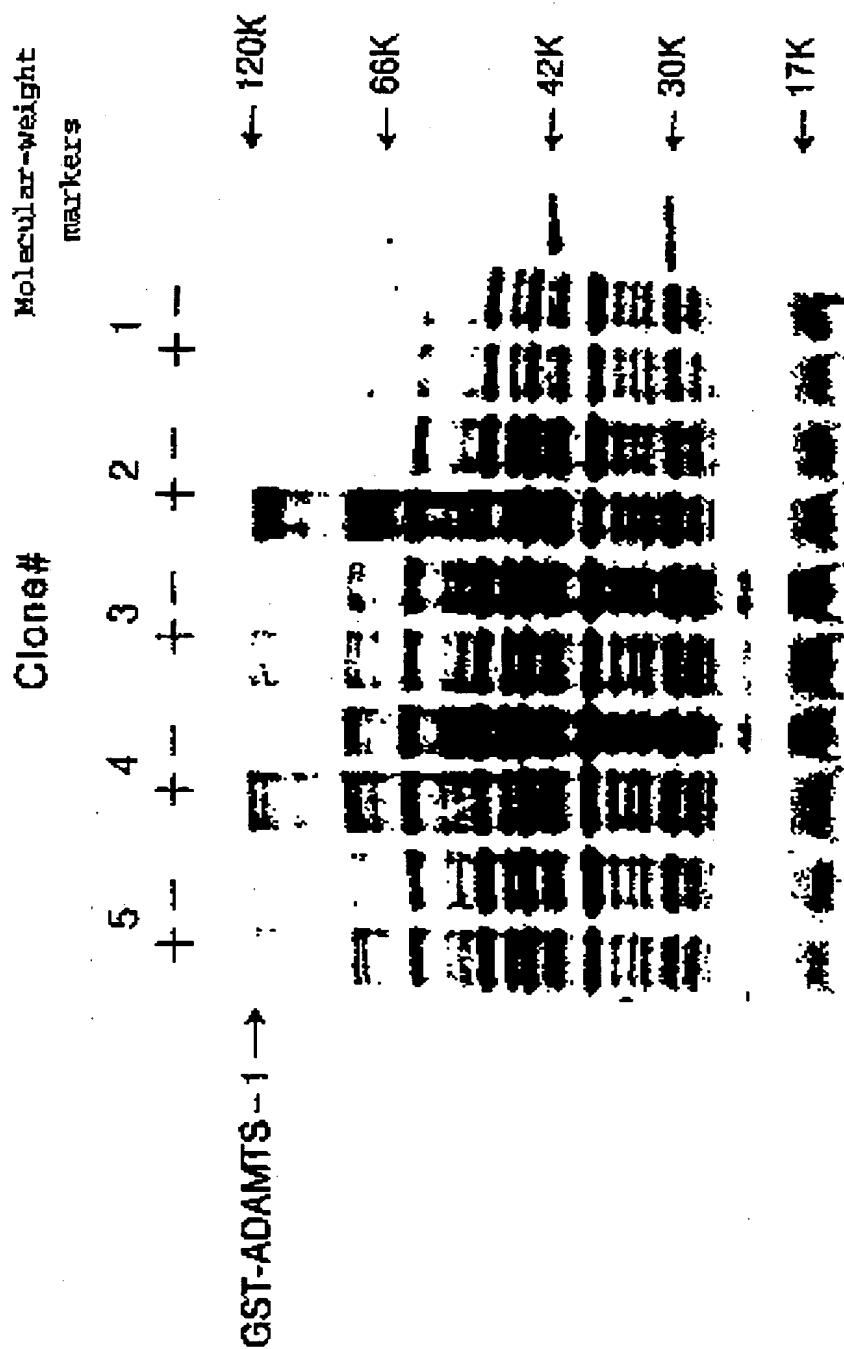


FIG. 16

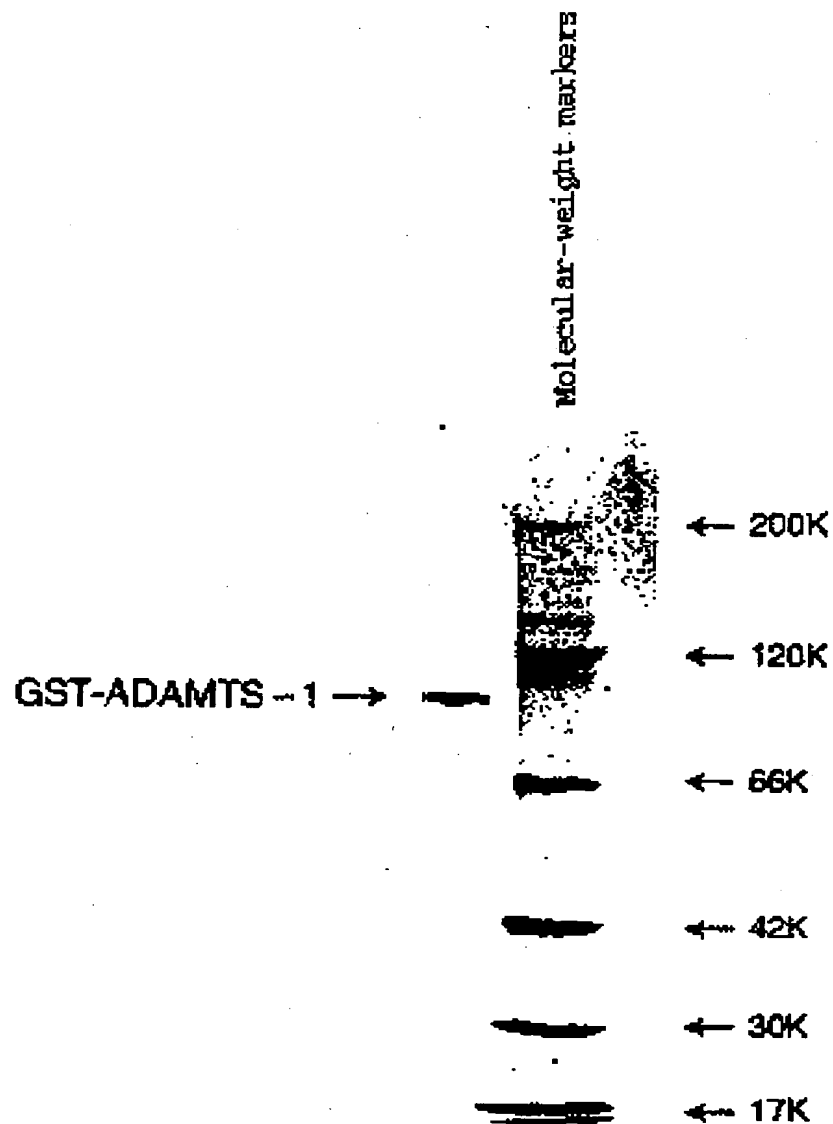
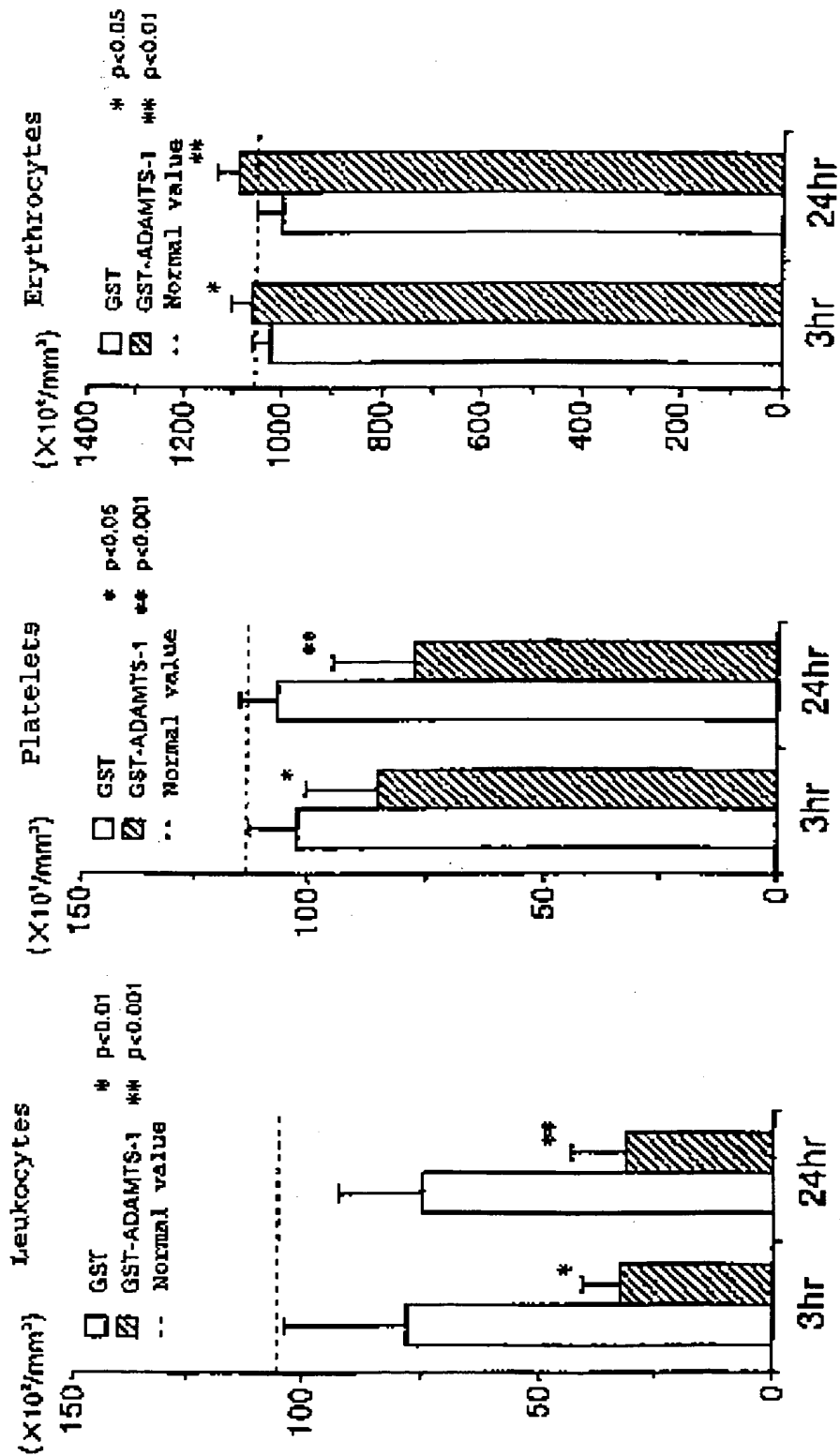




FIG. 17



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**